

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
der Universität Rostock

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. M. Tiedge

**Dualer Effekt der mtND2-Genmutation im Komplex I der
Atmungskette:**

ROS-Generierung und Induktion mitoprotektiver Effekte
im Verlauf des Alterungsprozesses

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Elizabeth Meyer

geboren am 12. Juni 1991 in Altdöbern

Rostock, März 2018

Dekan: Prof. Dr. med. univ. E.C. Reisinger, MBA

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002471



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

1. **Gutachter:** Prof. Dr. med. Markus Tiedge,
Universitätsmedizin Rostock, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Schillingallee 70, 18057 Rostock

2. **Gutachter/-in:** Prof. Dr. Ingo Rustenbeck,
Technische Universität Braunschweig, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
klinische Pharmazie, Mendelssohnstr. 1, 38106 Braunschweig

3. **Gutachter/-in:** Prof. Dr. med. Holger S. Willenberg,
Universitätsmedizin Rostock, Sektion Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten,
Zentrum für Innere Medizin, Ernst-Heydemann-Str. 6, 18057 Rostock

Datum der Einreichung: 28.05.2018

Datum der Verteidigung: 07.05.2019

„Denn um klar zu sehen, genügt ein Wechsel der Blickrichtung.“

Antoine de Saint-Exupéry

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht über Alterungstheorien und Zellalterung	1
1.2	Mitochondrien	3
1.2.1	Aufbau und Funktion von Mitochondrien	3
1.2.2	Das mitochondriale Genom	4
1.2.3	Mitochondriopathien	5
1.2.4	TFAM und seine Interaktion mit der mtDNA	6
1.2.5	Aufbau und Funktion der Atmungskette	7
1.3	Reaktive Sauerstoffspezies	9
1.3.1	Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies	9
1.3.2	Oxidative Verteidigung und Entkopplung	11
1.3.3	Auswirkungen von ROS auf die Zellfunktion und den Organismus	12
1.3.4	Mitohormesis	14
1.4	ROS regulierte Proteine	15
1.4.1	Die Serin-Threonin-Kinase mTOR	15
1.4.2	Histone	16
1.4.3	Der Alterungsmarker p53	17
1.5	Metabolisches Syndrom als altersrelevante Erkrankung im Zusammenhang mit ROS	18
1.5.1	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung	19
1.6	Tiermodell	19
1.7	Zielstellung	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.2	Kits	23

2.1.3	Methodenspezifische Sonden und Antikörper.....	24
2.2	Verbrauchsmaterial.....	24
2.3	Geräte.....	25
2.4	Software.....	26
2.5	Methoden.....	26
2.5.1	Versuchstiere	26
2.5.2	Tierhaltung	26
2.5.3	Bestimmung des Körpergewichts.....	27
2.5.4	Bestimmung der Blutzuckerkonzentration	27
2.5.5	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels MitoSOX.....	27
2.5.6	Genexpression	28
2.5.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.5.6.2	cDNA-Synthese	29
2.5.6.3	Quantitative Echtzeit-PCR	30
2.5.7	Bestimmung der mitochondrialen DNA.....	32
2.5.7.1	DNA-Isolierung.....	32
2.5.7.2	Agarosegelelektrophorese [135].....	33
2.5.7.3	Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl.....	33
2.5.8	Proteinanalyse.....	35
2.5.8.1	Herstellung von zellfreien Lysaten.....	35
2.5.8.2	Proteinbestimmung nach Bradford [136]	35
2.5.8.3	SDS-PAGE [137]	35
2.5.8.4	Western blot Analyse.....	38
2.5.9	Blutbildanalyse	39
2.5.10	Statistische Auswertung	39
3	Resultate	40
3.1	Altersabhängige Entwicklung des Körpergewichts von ALR- und AKR- Mäusen.....	40

3.2	Altersabhängiger Verlauf der Nüchtern-Blutglukosekonzentration.....	41
3.3	Bestimmung von Superoxiden mittels MitoSOX.....	41
3.4	Kopienzahl mitochondrialer DNA (mtDNA).....	43
3.5	Altersabhängige Expression mitochondrialer Gene in Lebergewebe.....	43
3.5.1	Die ND2-Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I.....	44
3.5.2	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A (TFAM).....	44
3.5.3	Superoxiddismutase Typ 1 (SOD1).....	45
3.5.4	Superoxiddismutase Typ 2 (SOD2).....	46
3.5.5	Katalase	47
3.5.6	Uncoupling Protein 2 (UCP2)	48
3.5.7	Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)	49
3.6	Altersabhängige Proteinexpression von Alterungsmarkern und Atmungskettenkomplexen in Lebergewebe	49
3.6.1	Histon H2A.X.....	50
3.6.2	p53	51
3.6.3	Atmungskettenkomplexe	51
3.7	Blutanalyse	53
4	Diskussion	54
4.1	Auswirkungen des <i>ND2</i> -Genpolymorphismus auf das Körpergewicht und die Blutglukosekonzentration im Verlauf der Alterung	54
4.2	Einfluss der <i>mtND2</i> -Genmutation auf die mitochondriale Dynamik im Verlauf der Alterung.....	55
4.3	Auswirkungen der <i>mtND2</i> -Mutation auf die altersabhängige Akkumulation von Superoxidanionen	57
4.4	Auswirkungen der <i>mtND2</i> -Mutation auf die altersabhängige Genexpression von antioxidativen Proteinen.....	58
4.5	Einfluss des <i>mtND2</i> -Gens auf die altersabhängige Expression von Seneszenzmarkern im B6-Mausstamm	61

4.6	Immunzelladaptation der ALR- und AKR-Maus	62
4.7	Einfluss der mtND2-Mutation auf mitoprotektive Signalwege und die Entstehung altersrelevanter Erkrankungen	63
4.8	Ausblick.....	65
5	Zusammenfassung	66
6	Thesen.....	67
7	Literaturverzeichnis	68
Anhang	82
	Abkürzungsverzeichnis	82
	Abbildungsverzeichnis	85
	Tabellenverzeichnis	87
	Eigenständigkeitserklärung	88
	Lebenslauf	89
	Tagungsbeiträge.....	90
	Danksagung	91

1 Einleitung

1.1 Übersicht über Alterungstheorien und Zellalterung

Der Begriff des Alterns beschreibt einen fortwährenden und generalisierten Funktionsverlust von Zellen und Geweben eines Organismus, der in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Umwelteinflüssen und Krankheiten resultiert und letztlich zum Tod führt. Typischerweise geht dieser Alterungsprozess z.B. mit Fertilitäts-, Gewichts- und Haarverlust, Osteoporose, Gefäßsklerose, Neurodegeneration und erhöhtem Tumorrisiko einher [1,2].

Die Geschwindigkeit des Alterns wird durch artspezifische endogene Faktoren und Umwelteinflüsse bestimmt. Wie die Alterung eines Organismus jedoch initiiert wird, ist seit Beginn des letzten Jahrhunderts Gegenstand intensiver Forschung. Einige gängige Alterungstheorien sollen im Folgenden beschrieben werden:

- (1) ROS-Theorie: Ein erster Erklärungsansatz für die Zellalterung ist die Auswirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf Zellen eines Organismus. Im Jahre 1956 postulierte Harman die freie Radikaltheorie des Alterns. Sie basierte auf der Beobachtung, dass es in alternden Zellen zu ansteigenden ROS-Konzentrationen kommt. Die Sauerstoffspezies rufen Zellschäden hervor, wobei insbesondere die mitochondriale DNA (mtDNA) sensibel für Schäden durch ROS ist [3].
- (2) Mitochondriale DNA-Mutationen: Im Verlauf der Alterung akkumulieren Mutationen der mitochondrialen DNA [4]. Diese korrelieren mit einer eingeschränkten mitochondrialen Energieproduktion und einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [5]. Im Verlauf kommt es zu einer zunehmenden mtDNA-Fragmentierung. Die Fragmente lagern sich anschließend in die nukleäre DNA (nDNA) ein und können die genetische Information einer Zelle verändern [6,7]. Aufgrund der Einbeziehung freier Radikale in diese Theorie, wird die Kombination beider Theorien heute als *mitochondrial theory of aging* bezeichnet [4,8].
- (3) Somatische Mutationen: Eine weitere Hypothese ist die *somatic mutation theory*. Hier nehmen mit fortschreitendem Alter aus verschiedensten Gründen somatische Mutationen und Schäden der nukleären DNA zu. Neben der Entstehung fehlgefalteter, dysfunktionaler Proteine kann ebenso eine Tumorentstehung und das Altern von Zellen resultieren [1]. Dabei ist zu berücksichtigen, dass mehr als 90 % der mitochondrialen Proteine auf dem nukleären Genom kodiert sind.

- (4) Telomere: Die *telomere loss theory* erklärt den Alterungsprozess mit der Verkürzung der Chromosomenenden. Am Ende einer jeden Replikation eines nukleären DNA-Strangs können die Chromosomenenden nicht vollständig verdoppelt werden. Um den Verlust wichtiger Erbinformation zu verhindern, befinden sich repetitive nicht kodierende Sequenzabschnitte, die sogenannten Telomere, an den Chromosomenenden. Erbinformation kann demzufolge erst verloren gehen, wenn diese Telomere nach vielen Replikationsvorgängen aufgebraucht sind. Dieser Vorgang kann auch durch den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies beschleunigt werden [1,9,10].
- (5) *Unfolded Protein* Akkumulation: Des Weiteren kann eine fehlerhafte Proteinbiosynthese die Akkumulation nicht-funktionstüchtiger Proteine bedeuten und aufgrund der Fehlfunktionen innerhalb der Zelle den Alterungsprozess beschleunigen. Dies wird als *protein error theory of aging* oder auch *damage accumulation theory of aging* bezeichnet [11].
- (6) Gerontogene: Dies sind Gene, die normalerweise metabolische und kommunikative Aufgaben erfüllen. Sie kodieren für intrazelluläre Signalmoleküle und induzieren Abwehrprozesse. Nach der Reproduktion des Organismus könnten sie allerdings ihre Funktion im Sinne einer Über- oder Unterfunktion ändern und nachteilig auf den Zellstoffwechsel wirken. Dadurch kann die Entstehung altersassoziierter Erkrankungen beschleunigt werden [11,12].

All diese Theorien führen wahrscheinlich nicht allein, sondern gewebespezifisch in Kombination, zum Altern einer Zelle (*network theories of aging*). Proliferierende Zellen zeigen beispielsweise eine größere Anfälligkeit für Mutationen und Telomerverkürzung. Postmitotische Zellen sind anfälliger für Schäden aufgrund von Proteinfehlfunktionen [1,13]. Dufour und Kollegen gehen davon aus, dass unterschiedliche Auslöser immer denselben Signalweg induzieren, welcher unweigerlich zur Zellalterung führt [4]. Dabei kommt es entweder zur Apoptose der Zelle oder zu einem Zellzyklusarrest im Stadium G₁ im Sinne der Seneszenz. Beide Prozesse verhindern die Entartung von Zellen [1]. Sowohl die Seneszenz als auch die Apoptose führen zur Alterung, da bei der Seneszenz die Gewebeerneuerung behindert wird. Die Seneszenz ist im Gegensatz zur Apoptose jedoch reversibel, da seneszente Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten können [14].

Unabhängig von der Ursache, die zur Zellalterung führt, konnten verschiedene Forschungsgruppen immer dieselben Zellveränderungen im Verlauf der Alterung beschreiben: (1) eine Zunahme von Mutationen auf dem mitochondrialen Genom, (2) strukturveränderte

Mitochondrien, (3) die Abnahme der Atmungskettenfunktion und (4) Zunahme von Proteinschäden und Proteinfehlfaltungen [15,16].

1.2 Mitochondrien

1.2.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

Die in 1.1 beschriebenen mitochondrialen Veränderungen im Verlauf der Alterung machen die besondere Bedeutung von Mitochondrien im Alterungsprozess deutlich. Daher soll im Folgenden umfassend auf deren Bau und Funktionsweise eingegangen werden.

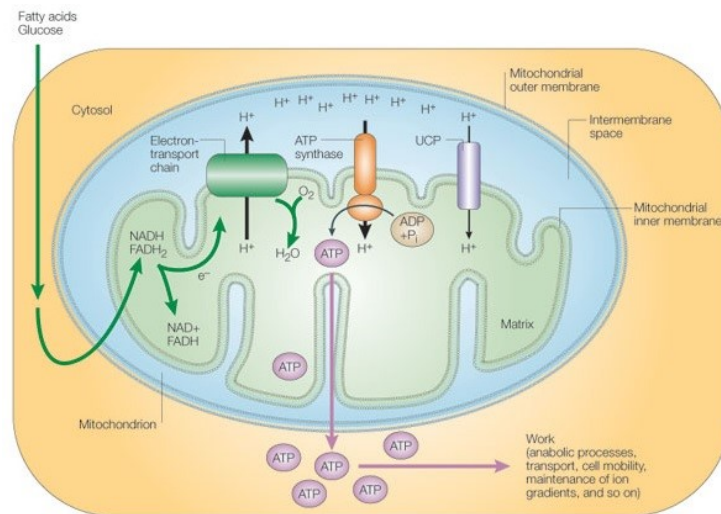


Abb. 1.1: Aufbau und Funktionsweise eines Mitochondriums [17]

Ein einzelnes Mitochondrium wird durch die äußere Mitochondrienmembran begrenzt. Die innere Mitochondrienmembran unterteilt das Mitochondrium in zwei Kompartimente: innerhalb der inneren Mitochondrienmembran befindet sich die mitochondriale Matrix, in der sich die Enzyme des Citratzyklus, der β -Oxidation, des Keto- und Aminosäureabbaus und der Häm synthese, sowie das mitochondriale Genom und Ribosomen befinden. Durch das eigene Genom können mitochondriale Proteine des OXPHOS-Systems synthetisiert werden [18]. Zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran liegt der sogenannte Intermembranraum, in dem sich ein Bestandteil der Atmungskette, das Cytochrom c, befindet [18,19]. Die innere Mitochondrienmembran bildet durch starke Oberflächenvergrößerung fingerförmige Ausläufer, die sog. Cristae. Durch die Oberflächenvergrößerung finden unzählige Atmungskettenkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran Platz, um adäquat Energie in Form von ATP für die Zelle bereitstellen zu können (Abb. 1.1). Die innere Membran ist fast undurchlässig für viele Ionen und polare Moleküle, wodurch ein hohes Membranpotenzial von ca. 180 mV entsteht. Im Gegensatz dazu ist die äußere Membran, dank

des porenbildenden Proteins VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*), durchlässig für die meisten kleinen Moleküle, z.B. NAD, ATP und Coenzym A [20–23].

Glukose und Fettsäuren werden über die Zellmembranen in die Zelle aufgenommen und durch Enzyme der Glykolyse, β -Oxidation und des Citratzyklus verstoffwechselt. So entstehen zudem Reduktionsäquivalente in Form von NADH/H⁺ und FADH₂. Diese werden in die mitochondriale Atmungskette eingespeist und zur Synthese von ATP genutzt [17,18,24].

1.2.2 Das mitochondriale Genom

Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom aus einer aus 16.569 Basenpaaren bestehenden zirkulären DNA (mtDNA), wobei mehrere mtDNA-Kopien in einem Mitochondrium vorliegen [25].

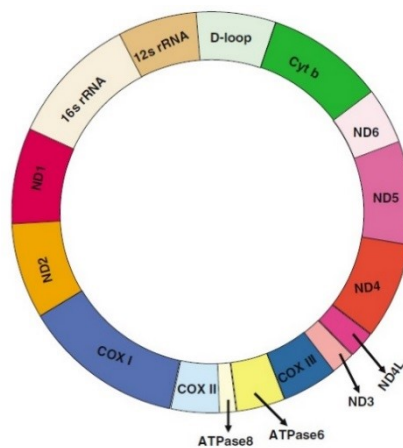


Abb. 1.2: Mitochondriale DNA [24]

Die zirkuläre mitochondriale DNA kodiert verschiedene mitochondriale Proteine, v.a. Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe, wie auch die Untereinheit ND2 des Komplex I. Cytochrom-c-Untereinheiten I, II und III (COI, COII, COIII); ATPase-Untereinheiten 6 und 8 (ATP6, ATP8); Cytochrom b (CYTb); Untereinheiten 1 bis 6 der NADH-Dehydrogenase des Komplex I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6)

Die mtDNA kodiert tRNA, 12S- und 16S-rRNA-Proteine, sowie Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen, wie die Untereinheiten 1 bis 6 der NADH-Dehydrogenase des Komplex I, Cytochrom b des Komplex III, die Cytochrom-c-Untereinheiten I, II und III des Komplex IV und die ATPase-Untereinheiten 6 und 8 des Komplex V (Abb. 1.2) [21,24,26]. Der Großteil der mitochondrialen Proteine ist jedoch auf der nukleären DNA (nDNA) der Zelle kodiert. Diese werden im Zytosol synthetisiert und anschließend ins Mitochondrium transportiert [18]. Im Gegensatz zur nDNA ist die mtDNA nicht durch Histone und Polyamine geschützt und besteht ausnahmslos aus Exons. Sie liegt jedoch nicht frei in der Matrix vor, sondern bildet mit dem mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM) einen Komplex aus, welcher nahe am Atmungskettenkomplex I an die innere Mitochondrienmembran gebunden ist

[2,22]. Entgegen einer früher weit verbreiteten Meinung, wird heute angenommen, dass für das mitochondriale Genom gut funktionierende DNA-Reparatursysteme existieren, die Mutationen der mtDNA entgegenwirken können [2].

1.2.3 Mitochondriopathien

Erkrankungen der Mitochondrien werden als Mitochondriopathien bezeichnet. Entstehen können solche Mitochondriopathien durch:

- (1) spontane oder vererbte Mutationen des mitochondrialen Genoms [27],
- (2) Mutationen von nukleären Genen, die für mitochondriale Proteine kodieren [27,28],
- (3) Atmungskettenfehlfunktionen, die ohne das Vorliegen einer mtDNA-Mutation entstehen [27].

Es resultiert eine mitochondriale Dysfunktion, die zu vermehrter Superoxidanionen-Bildung, sowie Apoptose (über die Öffnung sogenannter *Permeability Transition Pores*) führt [29,30].

Mitochondriopathien können ein vollwertiges klinisches Krankheitsbild bedingen oder auch zu einem verkürzten Überleben führen [31]. Durch die maternale Übertragung von Mitochondrien und damit der mtDNA auf die Nachkommen können mitochondrial bedingte Erkrankungen vererbt werden. So tritt der maternal vererbte Diabetes mit Schwerhörigkeit, gehäuft nur bei Mutter und Kind auf. Außerdem erreichten Kinder langlebiger Mütter in statistischen Erhebungen öfter ein hohes Lebensalter, sodass die Langlebigkeit eines Organismus mit der Mitochondrienfunktion in Verbindung gebracht wurde [32].

Einige definierte Mutationen von Atmungskettenkomplexen mit ihren resultierenden Erkrankungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tab. 1.1: Durch mitochondriale Mutationen bedingte Erkrankungen [28]

Erkrankung	Klinik	Kodierender Atmungskettenkomplex
Generalisierte Gehirnatrophie	Gedächtnisverlust, Bewusstseinsveränderungen, Aphasie, veränderte Körperhaltung, unfreiwillige Muskelkontraktionen	I, III
Enzephalopathie	globale Gehirndysfunktion mit veränderten Mentalfunktionen, evtl. assoziiert mit Lungenfunktions- und Wachstumsstörungen, Insult	I, III, IV, V
LHON (Lebersche hereditäre Optikusneuropathie)	schmerzloser zentraler Sehverlust, evtl. assoziiert mit kardialer Erregungsleitungsstörung, veränderten Reflexen, Ataxie, sensorischer Neuropathie	I, III, IV, V

MELAS-Syndrom	mitochondriale Enzephalomyopathie, Lactatazidose, Schlaganfall-ähnliche Episoden	I
Sensorineurale Taubheit	progressiver Hörverlust bis zur völligen Ertaubung	I, IV
Parkinson-ähnliche Erkrankungen	früher Beginn der Parkinson-Symptome mit Tremor, Rigor, verlangsamten Bewegungen, posturaler Instabilität	I
Anfälligkeit für Alzheimer-Erkrankung	progressive Demenz	I
Anfälligkeit für M. Parkinson	Symptome: siehe oben	I

Die klinische Symptomatik der mitochondrial bedingten Erkrankungen nimmt mit dem Alter zu und wird auf eine Akkumulation von mtDNA-Mutationen zurückgeführt. Bei den meisten Erkrankungen liegt sowohl mutierte als auch gesunde mtDNA intrazellulär vor. Dies liegt daran, dass bei der Entstehung der Oozyten sowohl gesunde als auch erkrankte Mitochondrien von einer Stammzelle auf die Oozyten übertragen werden. Je nachdem ob auf einen Oozyten viele oder nur wenige kranke Mitochondrien übertragen werden, resultiert eine hohe, mittlere bzw. niedrige Mutationsdichte in diesem Oozyt [33].

Das Vorkommen von mutierter und gesunder mtDNA bezeichnet man als Heteroplasmie (niedrige bzw. mittlere Mutationsdichte). Beispielsweise zeigt das MELAS-Syndrom solch eine Heteroplasmie. Demgegenüber ist das LHON-Syndrom durch eine Homoplasmie mutierter mtDNA gekennzeichnet. Das heißt, es existiert fast nur mutierte mtDNA in den Mitochondrien einer Zelle oder eines Gewebes (hohe Mutationsdichte). Dieser Zustand ist irreversibel. Im Gegensatz dazu sind heteroplastische Gewebe dazu in der Lage durch Fusion und Teilung von Mitochondrien untereinander die Konzentrationen mutierter mtDNA niedrig zu halten [15,34,35]. Inwiefern das Verhältnis von mutierter zu gesunder mtDNA im Zusammenhang mit dem Auftreten oder der Schwere einer Erkrankung steht, ist Bestandteil aktueller Untersuchungen [15]. Wahrscheinlich ist aber, dass mtDNA-Mutationen einen bestimmten Schwellenwert überschreiten müssen, um klinisch auffällig zu werden [33,35].

1.2.4 TFAM und seine Interaktion mit der mtDNA

Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM) hat, anders als es sein Name vermuten lässt, weitere Aufgaben in Bezug auf die mtDNA als die Regulation der Genexpression.

Es handelt sich um ein Protein, das zwei *High Mobility Group*- (HMG-) Proteine enthält. Diese HMG-Proteine sind für die Bindung an der mtDNA verantwortlich [36–38]. So kann das gesamte mitochondriale Genom bedeckt und vor Schädigungen, z.B. durch ROS, geschützt werden [39,40]. Durch Bindung an einen *Light-Strand-Promotor* induziert er eine

U-Konfiguration der mtDNA. Auf diese Weise gelangt das C-terminale Ende von TFAM an den Transkriptionsstart und es können andere Promotorelemente wie die humane mitochondriale RNA-Polymerase (POLRMT) und der mitochondriale Transkriptionsfaktor B2 (TFB2M) binden [37,39,41,42]. Diese drei Bestandteile bilden den Initiationskomplex für die Replikation bzw. Transkription der mtDNA [33]. TFAM ist für die eigentliche Transkription wahrscheinlich nicht unbedingt erforderlich [43]. Vielmehr ist es essenziell für die korrekte Zusammenlagerung von Promotorelementen an die Transkriptionsmaschinerie [36].

1.2.5 Aufbau und Funktion der Atmungskette

Ein bedeutender Proteinkomplex in der inneren Mitochondrienmembran ist die, aus fünf Komplexen bestehende, Atmungskette. Diese entspricht einer Elektronentransportkette, in welcher die einzelnen Komplexe Elektronen an den nächsten Komplex abgeben können. Dabei sinken die Elektronen in ihrem Energieniveau. Die „verlorene“ Energie wird zum Transport von Protonen genutzt, wodurch ein Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran entsteht. Dieser Protonengradient wird durch die ATP-Synthase für die Generierung von ATP genutzt [22].

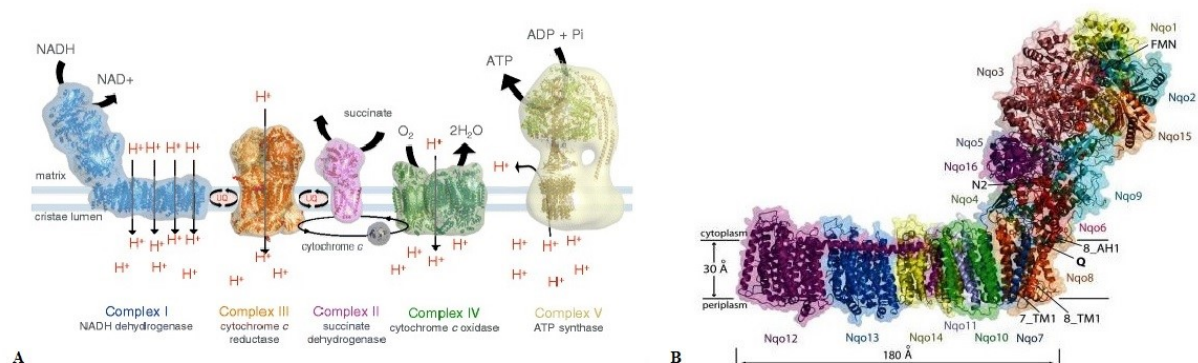


Abb. 1.3: Die mitochondriale Atmungskette [22,44]

In Abbildung A ist die, aus fünf Komplexen bestehende, mitochondriale Atmungskette dargestellt. Durch die Einspeisung von Elektronen können in den Komplexen I, III und IV Protonen (H⁺) aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Die so entstandene protonenmotorische Kraft kann anschließend durch Zurückpumpen der Protonen mittels Komplex V (ATP-Synthase) zur Synthese von ATP genutzt werden. Abbildung B zeigt die L-förmige Konfiguration des Komplex I des Bakteriums *Thermus thermophilus*, der vergleichbar mit dem humanen Komplex I ist. Die Elektroneneinspeisung erfolgt am hydrophilen Arm von FMN über Eisen-Schwefel-Cluster auf Ubichinon (Q). Die Protonentranslokation findet v.a. im transmembranären Teil durch Konfigurationsänderungen im oxidierten und reduzierten Zustand des Komplex I statt.

Der Komplex I der Atmungskette (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) besteht aus 44 Untereinheiten, die zusammen eine L-förmige Konfiguration bilden. Der waagerechte (lipophile) Arm ist in der Membran lokalisiert (transmembran), der senkrechte (hydrophile) Arm erstreckt sich in die Matrix (Abb. 1.3B) [23,31,45]. Die Funktion des Komplex I besteht

in der Übertragung von Elektronen von NADH/H^+ , über FMN und Eisen-Schwefel-Cluster auf Ubichinon. Zeitgleich dazu werden vier Protonen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transloziert (Abb. 1.3B) [20,44,46].

Der Komplex II der Atmungskette (Succinat-Dehydrogenase) ist gleichzeitig Bestandteil des Citratzyklus. Die Elektronen werden dem Komplex II in Form von FADH_2 zur Verfügung gestellt. Diese werden daraufhin, ähnlich wie im Komplex I, über Flavine und Eisen-Schwefel-Zentren auf Ubichinon übertragen. Dabei werden allerdings keine Protonen gepumpt, sodass bei Einschleusung von Elektronen in diesen Komplex insgesamt weniger ATP entsteht als bei Einschleusung in den Komplex I [23].

Der Komplex III (Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase) nimmt die auf Ubichinol übertragenen Elektronen auf und überträgt diese singular auf Cytochrom c. Dabei werden wiederum vier Protonen gepumpt [23].

In Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) werden vier Elektronen über verschiedene Coenzyme (Cu_A/Cu_B , Häm a, Häm a_3) von Cytochrom c auf Sauerstoff übertragen, sodass H_2O entsteht. Parallel dazu werden vier Protonen in den Intermembranraum gepumpt [23].

Durch den aktiven Transport der Protonen entsteht eine protonenmotorische Kraft, die im Wesentlichen aus zwei Komponenten besteht: dem elektrischen Gradienten (Membranpotential) ergänzt durch einen chemischen Gradienten (pH-Wert-Differenz) [47]. Im Komplex V (ATP-Synthase) kann diese protonenmotorische Kraft nach der chemiosmotischen Theorie von Peter D. Mitchell [48] genutzt werden, um die zuvor übertragenen Protonen durch die ATP-Synthase zurück in die mitochondriale Matrix zu pumpen. Die dabei freigesetzte Energie wird zur ATP-Synthese aus ADP genutzt [44,49].

Durch die Fluidität der inneren Mitochondrienmembran sind die Atmungskettenproteine nicht starr verankert, sondern beweglich und können verschiedene Varianten von Komplexen ausbilden. Dabei existieren zwei verschiedene Modelle zur Organisation von Atmungskettenkomplexen: (1) die zufällige Organisation von individuellen Komplexen und (2) die Assemblierung eines Superkomplexes, welcher als Respirasom bezeichnet wird [21,22]. Die Funktion der Superkomplexbildung besteht neben der Stabilisierung der einzelnen Komplexe in einer verbesserten katalytischen Aktivität, dem schnelleren und sicheren Shuttle der Substrate und der Isolierung reaktiver Metabolite [21,50–52].

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

1.3.1 Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

Als Nebenprodukt bei der Produktion von ATP können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Dies geschieht, wenn die Elektronen zwischen den Atmungskettenkomplexen nicht korrekt übertragen werden und mit Sauerstoff (O_2) reagieren (Abb. 1.4). Zu den reaktiven Sauerstoffspezies werden das Superoxidanion (O_2^-), Peroxid (O_2^{2-}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) gezählt.

Die Übertragung eines einzelnen Elektrons auf molekularen Sauerstoff führt zur Bildung eines Superoxidanions [20]. Diese Reaktion vollzieht sich als Folge endogener Quellen und exogener Trigger. Endogene ROS-Quellen sind die mitochondriale Atmungskette, Mikrosomen, Peroxisomen, Lipooxygenasen, Cytochrom P450 u.v.m. Exogene Trigger sind beispielsweise UV- und Röntgenstrahlung, Tabakrauch und Chemotherapeutika, die mit molekularem Sauerstoff ROS ausbilden [53–58]. Mitochondrien zählen im Zeitverlauf der Alterung jedoch zu den größten ROS-Produzenten [31,59,60]. Daher soll insbesondere auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies in diesen Organellen eingegangen werden.

Obwohl die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff im Komplex IV katalysiert wird, gilt der Komplex IV nicht als der Hauptproduzent von ROS, sondern die Komplexe I und III [61]. Bei einer fehlerhaften Elektronenübertragung vom Komplex I auf den Komplex III bildet sich in der mitochondrialen Matrix O_2^- (Abb. 1.4). Der Komplex III bildet Superoxidanionen v.a. im Q-Zyklus, da dort reaktive Ubichinonsemiradikale entstehen, die mit O_2 reagieren und dadurch Superoxidanionen bilden (Abb. 1.4) [2,57,62–64]. Unter physiologischen Bedingungen werden nur relativ wenig ROS durch die Atmungskette produziert (ca. 4 % der in die Atmungskette eingeschleusten Elektronen) [2,65]. Unter bestimmten, auch pathologischen, Bedingungen, nimmt dieser Prozentsatz jedoch deutlich zu:

- (1) wenn im Mitochondrium viel molekularer Sauerstoff oder große Mengen von Elektronen-Donatoren wie $NADH/H^+$ vorliegen, werden besonders viele Elektronen in die Atmungskette eingeschleust. Wird ein Schwellenwert an Elektronen überschritten, stauen sich diese innerhalb der Atmungskette auf, weil Komplex IV nicht schnell genug Elektronen auf O_2 übertragen kann. Durch den Aufstau werden Elektronen bereits in vorangeschalteten Atmungskettenkomplexen auf O_2 übertragen, wodurch jedoch kein Wasser, sondern ein Superoxidanion entsteht (Abb. 1.4) [66,67].

- (2) Mit steigendem Alter der Zelle nehmen die Aktivität der ATP-Synthase und der Elektronenfluss über die Atmungskette ab, wodurch sich Elektronen ebenfalls aufstauen und mit Sauerstoff reagieren (Abb. 1.4) [53,65,68].
- (3) Bei einem Mangel von NADH/H^+ in der Atmungskette kommt es zum reversen Elektronentransport. Dabei werden Elektronen von Ubichinol zurück auf Komplex I übertragen und es resultiert eine deutlich erhöhte Superoxidanionen-Produktion (Abb. 1.4) [69].
- (4) Eine weitere Ursache vermehrter ROS-Bildung sind Mutationen in mitochondrial kodierten Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen. Diese können eine Fehlfunktion des Elektronentransports in der Atmungskette und damit eine vermehrte ROS-Produktion bedingen [70].

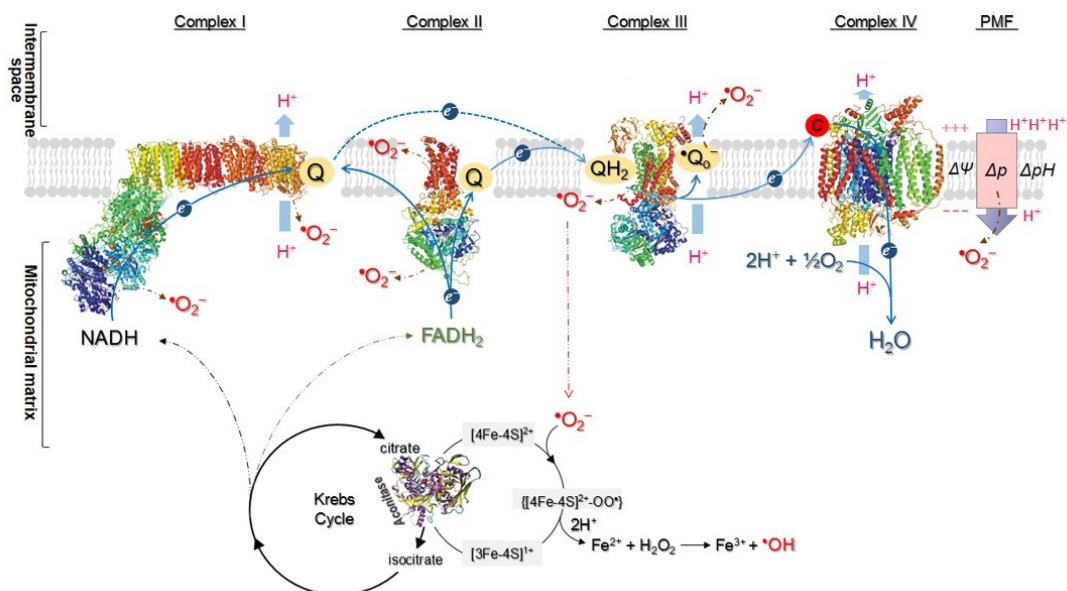


Abb. 1.4: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die mitochondriale Atmungskette [68]

Elektronen werden im Krebszyklus (auch Zitratzyklus) auf NAD^+ und FAD übertragen. Von diesen werden die Elektronen in die Atmungskette eingespeist. Der Transport innerhalb der Atmungskette ist durch die blauen Pfeile markiert. Die braunen Pfeile markieren das Entweichen der Elektronen und die Bildung von Superoxidanionen durch die Reaktion der Elektronen mit molekularem Sauerstoff. Protonenmotorische Kraft (PMF, $\Delta\psi$), Protonengradient (ΔpH).

Weitere reaktive Sauerstoffspezies entstehen durch die Metabolisierung von Superoxidanionen durch spezialisierte Enzyme der oxidativen Verteidigung. Die Katalase als eisenhaltiges Enzym bildet bei hohen Superoxidkonzentrationen hochreaktive Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion).

1.3.2 Oxidative Verteidigung und Entkopplung

Da ROS schädliche Auswirkungen auf die Zellfunktion haben können, entwickelten sich im Laufe der Evolution protektive Enzyme, die ROS zu unschädlichen Substraten metabolisieren können. Superoxidanionen werden durch die Superoxiddismutase (SOD) in das weniger reaktive H_2O_2 umgewandelt (Abb. 1.5) [55]. Dabei existieren verschiedene Typen der SOD: die 80 kDa schwere Cu/ZnSOD vom Typ 1 (SOD1) enthält sowohl Kupfer als auch Zink und ist hauptsächlich im Zytosol, im mitochondrialen Intermembranraum, dem Zellkern, Lysosomen und Peroxisomen lokalisiert. Die 32 kDa schwere Mangan enthaltende MnSOD vom Typ 2 (SOD2) befindet sich in der mitochondrialen Matrix. Dort kann sie durch die Atmungskette gebildete Superoxidanionen direkt dismutieren [23,29,71].

Das entstandene H_2O_2 kann innerhalb des Mitochondriums, im Zytosol und weiter in den Peroxisomen durch verschiedene Enzyme zu H_2O und O_2 metabolisiert werden. Zu diesen Enzymen gehören die Peroxiredoxine, die Glutathion-Peroxidasen, als auch die im Peroxisomen lokalisierte Katalase. Diese Enzyme verhindern die Reaktion von H_2O_2 mit Übergangsmetallen wie Eisenionen (Fe^{2+}) zum hochreaktiven Hydroxylradikal in der sogenannten Fenton-Reaktion (Abb. 1.5) [55,69,71].

Tab. 1.2: Reaktive Sauerstoffspezies und deren Metabolisierung [71]

ROS-Molekül	Herkunft	Metabolisierende Enzyme	Produkte
Superoxidanion (O_2^-)	Mitochondrien NADP-Oxidase Cytochrom P450	Superoxiddismutase (SOD)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ H_2O_2
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Peroxisomen Endoplasmatisches Retikulum	Katalase Peroxiredoxine	$\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ H_2O
Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$)	aus O_2^- und H_2O_2 mittels Übergangsmetallen (Eisen, Kupfer)	keine	Keine
Stickstoffoxid (NO)	Stickstoffoxid-Synthase	Peroxiredoxine	GSNO

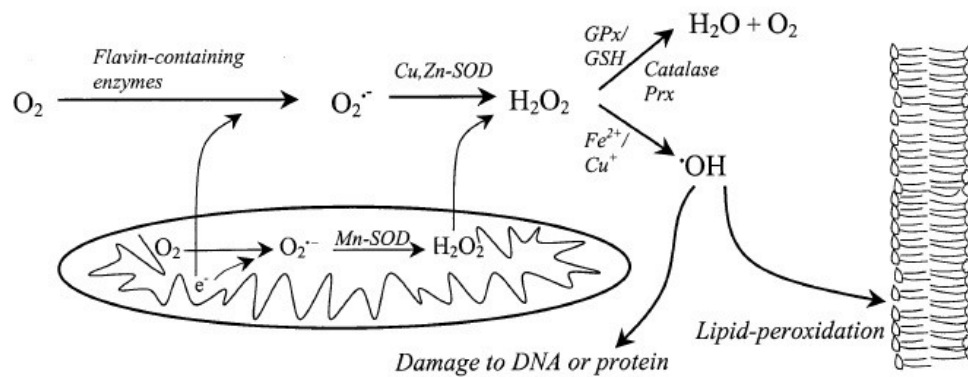


Abb. 1.5: Bildung und Metabolisierung reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle [71]

Die Bildung von Superoxidanionen erfolgt spontan und besonders in der Umgebung der mitochondrialen Atmungskette, da dort viele freie Elektronen vorliegen. Superoxidanionen können jedoch nicht durch Membranen diffundieren und verbleiben daher im Mitochondrium oder werden durch die SOD2 (MnSOD) zu H_2O_2 metabolisiert. H_2O_2 kann mit Übergangsmetallen (Eisen, Kupfer) reagieren und hoch reaktive Hydroxylradikale bilden. Es kann aber auch, katalysiert durch Glutathion, Glutathion-Peroxidase oder Katalase, zu Wasser und molekularem Sauerstoff reagieren. GSH (Glutathion), GPx (Glutathion-Peroxidase), Prx (Peroxiredoxine), Eisen (Fe^{2+}), Kupfer (Cu^+)

Ein weiterer Bestandteil der oxidativen Verteidigung, ist das Uncoupling Protein 2 (UCP2). Dieses liegt in unterschiedlich hohen Konzentrationen in verschiedensten Geweben vor. UCP2 bildet einen Kanal in der inneren Mitochondrienmembran, welcher Protonen aus dem Intermembranraum in die mitochondriale Matrix entlässt [72]. Dadurch wird der Protonengradient und das Membranpotential vermindert und es wird weniger ATP synthetisiert, da weniger Protonen durch die ATP-Synthase zurückfließen können (1.2.5) [73]. Hierdurch wird ein konstanter Elektronentransfer zwischen den Atmungskettenkomplexen erreicht und der reverse Elektronentransport reduziert [74]. Durch die effizientere Weitergabe der Elektronen zwischen den Atmungskettenkomplexen entstehen weniger Superoxidanionen [17,47,73,75].

Neben der enzymatischen Dismutation und Neutralisierung von ROS existieren weitere Möglichkeiten als antioxidativer Schutz im Mitochondrium. Beispielsweise verbessert die Superkomplexbildung in der Atmungskette den Elektronentransfer. Die Wahrscheinlichkeit, dass Elektronen bereits vor Erreichen des Atmungskettenkomplexes IV „entweichen“ und mit O_2 reagieren, wird minimiert. Dadurch kann eine höhere Superoxidbildung vermieden werden [50,52].

1.3.3 Auswirkungen von ROS auf die Zellfunktion und den Organismus

ROS können sowohl physiologische als auch pathologische Auswirkungen auf eine Zelle haben. Diese sind von verschiedenen chemischen Eigenschaften der ROS abhängig. Nicht jedes

Sauerstoffradikal ist für die Zelle gleich schädlich. Die wohl schädlichste Sauerstoffspezies ist $\cdot\text{OH}$, da es sehr stark mit Biomolekülen reagiert. Weniger schädlich, da weniger reaktiv, sind Superoxidanionen, welche zudem nicht membrangängig sind. Da sie vornehmlich in der mitochondrialen Matrix produziert werden, haben sie weniger Auswirkungen auf die gesamte Zelle. Das am wenigsten reaktive Sauerstoffradikal ist H_2O_2 . Es kann jedoch leicht durch Membranen diffundieren und in anderen Zellkompartimenten die Bildung von Hydroxylradikalen verursachen (Abb. 1.5) [71]. Die gute Membrangängigkeit führte auch zum Postulat, dass H_2O_2 ebenso die Funktion als Signalmolekül innerhalb der Zelle ausüben kann [71,76]. NO hat eher eine antioxidative als eine oxidative Wirkung. Es reagiert mit freien Radikalen und führt zu deren Neutralisierung. Es kann aber auch mit Superoxidanionen zum hoch zytotoxischen Peroxynitrit reagieren [71].

Neben der Reaktivität von ROS ist aber auch der Ort ihrer Entstehung für die zellulären Auswirkungen von Bedeutung. Komplex I der Atmungskette gibt Superoxidanionen beispielsweise direkt in die mitochondriale Matrix ab, wohingegen Komplex III ROS zusätzlich in den Intermembranraum freisetzt (Abb. 1.4). Da das mitochondriale Genom in der mitochondrialen Matrix gelegen ist, kann dieses durch die Superoxidanionen geschädigt werden [2,77]. Wegen der kurzen Halbwertszeit und der schlechten Diffusibilität werden mitochondriale Superoxidradikale im zytosolischen Kompartiment nicht mit Zellschäden sondern Signalvermittlung assoziiert [78].

Weitere wichtige Faktoren stellen die Konzentration an ROS, sowie deren Dauer der Exposition dar. In niedrigen Konzentrationen dienen ROS als zelluläre Signalmoleküle für Zellproliferation, Zelldifferenzierung, zelluläre Seneszenz oder Zelltod [55,59,79,80]. In Zellen des Immunsystems sind ROS für die Abwehr mittels *oxidative burst* sowie für die T-Zellaktivierung essentiell [78,81]. Weiterhin führen ROS Moleküle zur Aktivierung von Signalwegen, die eine verlängerte Lebenszeit zur Folge haben [5,81–83]. All diese Funktionen resultieren aus der oxidativen Modifikation von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren sowie der Inaktivierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen [29,56,71]. Die antioxidativen Enzyme SOD1, SOD2, Katalase und UCP2 regulieren die intrazelluläre ROS-Konzentration und somit auch Signalwege der Stressantwort und Zellproliferation [64,69].

Auf molekularer Ebene bewirken ROS eine unspezifische Zerstörung von nukleärer und mitochondrialer DNA, Lipiden und Proteinen sobald die oxidative Verteidigung überlastet ist [84]. Die entstandenen oxidativen Schädigungen können zur Akkumulation von oxidierten Zellbestandteilen führen und hierüber Funktionseinschränkungen in biologischen Systemen bedingen [77]. Auf Zellebene wurden Effekte auf die Tumorentstehung, Zellschrumpfung,

Chromatinkondensation, Öffnung von Permeabilitäts-Transitions-Poren und Apoptose beschrieben [10,19]. Durch die duale Wirkung als Signalmoleküle und Oxidantien sind ROS an zahlreichen multifaktoriellen Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose, Myokardinfarkt, arterieller Hypertonus, M. Parkinson, M. Alzheimer, Autoimmunerkrankungen und Tumorentstehung beteiligt [10,24,57,85–89]. Auch bei der Pathogenese des Diabetes mellitus als wichtigste Stoffwechselerkrankung spielen reaktive Sauerstoffspezies über die Wirkung auf die Betazellen des Pankreas und die Leber eine entscheidende Rolle [90,91].

1.3.4 Mitohormesis

Während die freie Radikalthorie schädliche Effekte der mitochondrialen ROS als wichtiges Element der Zellalterung ansah (1.1) [3,8], wird die zelluläre Wirkung von ROS heute differenzierter gesehen. Bereits 1943 wurde postuliert, dass vermeintlich schädliche Substanzen durch Auslösung einer Hormesis durchaus positive Effekte auf einen Organismus haben können [92]. In Zusammenhang mit mitochondrial gebildeten ROS entstand der Begriff der mitochondrialen Hormesis, kurz Mitohormesis [93,94].

Die Mitohormesis beschreibt, dass eine kurzzeitige und geringe Erhöhung der Superoxidanionen-Konzentration zu zellprotektiven Effekten führt, während hohe Superoxidanionen-Konzentrationen Zellschäden oder sogar den Zelltod hervorrufen können [11,94–96].



Abb. 1.6: Mitohormesis (modifiziert nach [97])

Verschieden hohe Konzentrationen von ROS können unterschiedliche Effekte auf die Zelle haben. Niedrige Konzentrationen bedingen die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, indem ROS z.B. als Signalmoleküle dienen. In etwas höheren Konzentrationen führen sie zum „positiven oxidativen Stress“, indem sie eine Art Trainingseffekt auf die Zelle haben, der daraufhin zu einer erhöhten Belastbarkeit der Zelle führt. Wenn der oxidative Stress die antioxidativen Kapazitäten stark überschreitet, führt dieser Zustand zu Zellschäden oder sogar zum Zelltod [97,98].

Wie in 1.3.3 und Abb. 1.6 dargestellt, können geringe Mengen an ROS den Zellmetabolismus und die antioxidative Abwehr durch ihre Funktion als Signalmoleküle verbessern. Da ROS sehr

kurzlebige Moleküle sind, wird der mitohormetische Effekt über die reversible Oxidation von Makromolekülen wie Proteine und Lipide bewirkt [81,97]. Solche Proteine sind z.B. FOXO/ DAF-16, NRF2/ SKN-1 und HSP-1. Diese können wiederum Enzyme der oxidativen Verteidigung auf der Ebene des Genexpressionsprofils beeinflussen [94]. Als Konsequenz werden mitochondriale ROS besser inaktiviert und so auf einem niedrig stabilen Niveau gehalten. Dieser mitohormetische Effekt trägt wesentlich zu einem verzögerten Alterungsprozess bei [94].

Übersteigt der oxidative Stress das Maß für die Kompensation durch adaptive Zellreaktionen und die oxidative Verteidigung, kommt es zur dauerhaften Schädigung der Zellen oder sogar zum Zelltod [97].

Ein weiteres Modell der positiven ROS-Eigenschaften wurde von Hekimi et al. entwickelt [99]. Dieses besagt, dass ROS nicht Ursache, sondern Folge eines erhöhten Zellstress sind. Sie besitzen damit physiologische Funktionen als Stressmarker. Die Autoren postulieren zudem, dass ROS-Exposition in jungen Jahren zu verlangsamer Alterung führen kann, während sie im späteren Lebensalter den Zellstress verstärkt und zur Entstehung alterstypischer Erkrankungen beiträgt [99].

1.4 ROS regulierte Proteine

1.4.1 Die Serin-Threonin-Kinase mTOR

Das Protein *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) ist eine atypische Serin-Threonin-Kinase aus der Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen. Es fungiert als Sensor für das Nährstoffangebot einer Zelle und adaptiert den Stoffwechsel [23,100]. mTOR ist in der äußeren Mitochondrienmembran und im Zytoplasma lokalisiert. Durch Interaktion mit anderen Proteinen bilden sich die Multiproteinkomplexe mTOR-Komplex 1 und 2, welche funktionell miteinander verbunden sind [23,101].

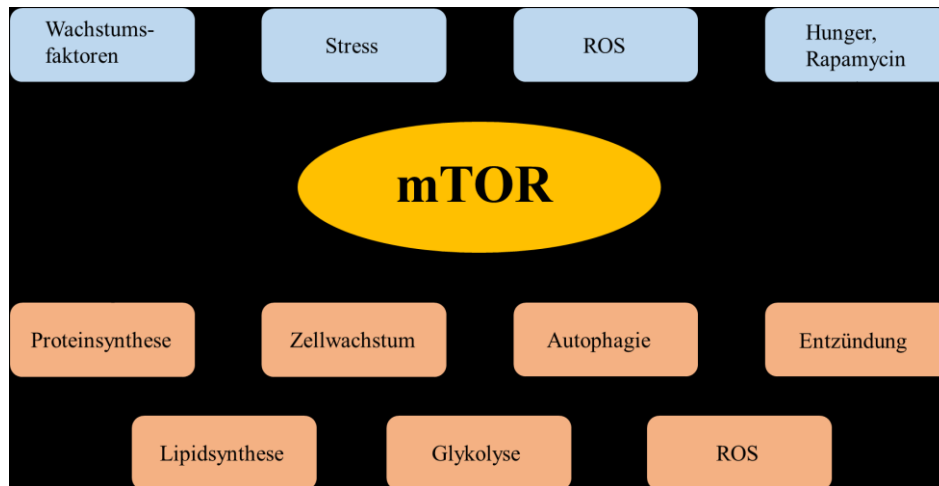


Abb. 1.7: Überblick über die Rolle von mTOR im Zellstoffwechsel (modifiziert nach [101])

Das *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) reagiert auf verschiedene Aktivatoren (z.B. hohes Nährstoffangebot) und Hemmstoffe (z.B. Rapamycin) mit der Induktion bzw. Hemmung von Stoffwechselwegen. So können über die Anregung der Protein- und Lipidsynthese das Zellwachstum induziert und andererseits die Autophagie gehemmt werden.

mTOR steht als Regulator im Zentrum eines komplexen Zellstoffwechsels. Neben dem Nährstoffangebot kann mTOR aber auch durch Insulin, dem Protein p53 und ROS aktiviert werden. Eine Aktivierung bedingt durch gesteigerte Protein- und Lipidsynthese ein vermehrtes Zellwachstum (Abb. 1.7) [23,100,102,103]. Gleichzeitig wird jedoch auch die Autophagie gehemmt. Dieses Szenario begünstigt die Akkumulation dysfunktionaler Zellbestandteile [103,104]. Über diesen Mechanismus beschleunigt mTOR die Seneszenz und das Altern von Zellen [12].

Stress, Hunger und Rapamycin führen zur Hemmung von mTOR. Dadurch werden Autophagie, Wachstumsarrest, DNA-Reparatur und die Reduktion der Proteinbiosynthese initiiert (Abb. 1.7) [23,100,102,105]. Außerdem kommt es zur verminderten Synthese von ROS und einer vermehrten Aktivität der antioxidativen Enzyme [106–108]. Dieser Zustand scheint der Zellalterung entgegenzuwirken. Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* und Säugetieren ergaben nach Inhibierung von mTOR eine Verlängerung der Überlebenszeit und eine geringere Inzidenz altersassoziierter Erkrankungen [14,101,108,109].

1.4.2 Histone

Histone spielen neben der Kondensation der nukleären DNA im Nukleosom eine wichtige Rolle für die Regulation der Genexpression [23,110–112].

Hierbei verändern Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung der Histone den Zugang zur Transkriptionsmaschinerie [113]. Die Acetylierung von Lysinresten senkt die Affinität der

Histone zur DNA und es können Vorgänge wie die Genexpression und DNA-Reparatur angeregt werden [110].

Ein besonderer Histontyp ist das H2A.X-Protein. Es gehört zur Familie der H2A-Histone, ist gleichmäßig an der nDNA verteilt und Bestandteil der *DNA Damage Response* (DDR). Es ist zu betonen, dass Histone nicht im Mitochondrium vorliegen und die mtDNA nicht schützen können. Hieraus erklärt sich die höhere Sensibilität der mtDNA gegenüber oxidativen Schädigungen [111,112].

1.4.3 Der Alterungsmarker p53

Das Protein p53 ist bekannt durch seine Funktion als Tumorsuppressor. Es verhindert die Entartung von Zellen, indem es zu Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Apoptose oder zellulärer Seneszenz potenziell entartungsgefährdeter Zellen führt [23,114,115]. Zur Aktivierung von p53 kommt es durch ROS, DNA-Schäden, Hypoxie, Telomerverkürzung und verschiedene Onkogene [116]. Hohe p53-Konzentrationen infolge starker Zellschädigungen bewirken die Apoptose einer Zelle. Der Tumorsuppressor p53 transloziert dann ins Mitochondrium und führt zur Cytochrom-c-Freisetzung sowie zur Aktivierung einer Caspase-Signalkaskade. Die Apoptose wird eingeleitet, um eine Entartung der Zelle im Verlauf der Alterung zu vermeiden [23,117,118].

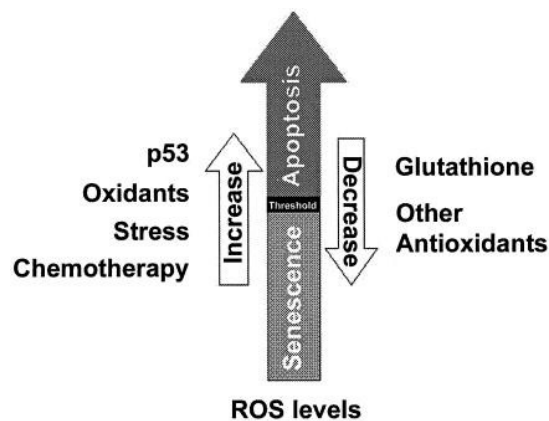


Abb. 1.8: Zusammenhang zwischen p53 und ROS-Konzentration [117]

Das Protein p53 führt zur Erhöhung der ROS-Konzentration. Ab einem bestimmten Schwellenwert kommt es nicht mehr nur zur Seneszenz, sondern zur Apoptose der Zelle. Dadurch kann eine Entartung der Zelle im Sinne der Tumorentstehung vermieden werden.

1.5 Metabolisches Syndrom als altersrelevante Erkrankung im Zusammenhang mit ROS

Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM), Atherosklerose mit Infarkten des Myokards und ZNS sind wesentliche altersassoziierte Erkrankungen. Auch Herzinsuffizienz, Osteoporose, Polyarthrose, Krebserkrankungen, Infektionen und neurologische Erkrankungen wie die Alzheimer-Demenz, Morbus Parkinson, Normaldruckhydrozephalus und der Hirninfarkt zeigen erhöhte Inzidenzen mit Zunahme des Lebensalters [119,120]. Bei all diesen Erkrankungen wurden ROS als pathogenetische Faktoren beschrieben (1.3.3).

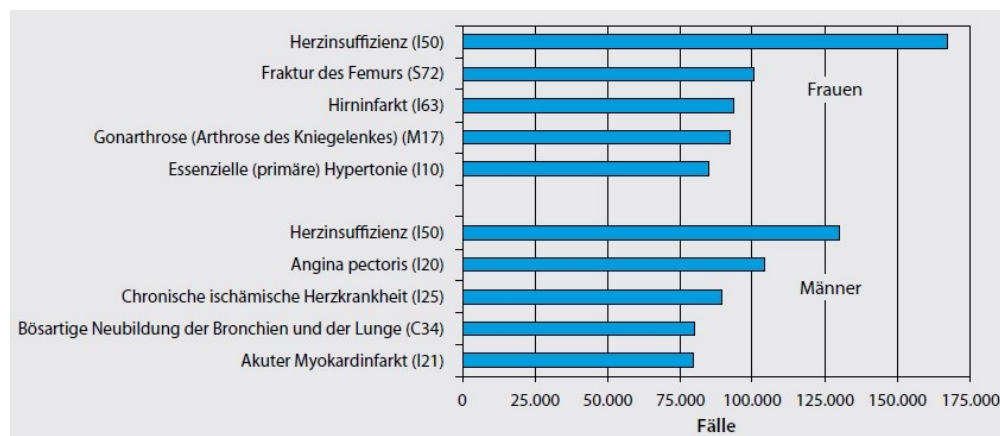


Abb. 1.9: Häufigste Diagnosen der aus dem Krankenhaus entlassenen vollstationären Patienten im Alter von 65 Jahren und älter [120]

Sowohl bei Frauen als auch bei Männern zählen kardiovaskuläre Erkrankungen wie Hirninfarkt, arterielle Hypertonie, Angina pectoris und der akute Myokardinfarkt zu den wichtigsten Erkrankungen im Alter. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind dabei als wichtigste Folge des metabolischen Syndroms anzusehen und machen bis zu 43 % der Todesfälle in Deutschland aus.

Als metabolisches Syndrom (oder auch Wohlstandssyndrom) wird eine Kombination aus

- abdomineller Adipositas (Taillenumfang > 80 cm bei Frauen und > 94 cm bei Männern),
- Hepatosteatose,
- erhöhten Nüchtern-Triglyceriden (> 150 mg/dl bzw. 1,7 mmol/l),
- verminderten HDL und erhöhten LDL,
- arteriellem Hypertonus (> 130/85 mmHg),
- gestörter Glukosetoleranz (> 100 mg/dl bzw. 5,6 mmol/l) bzw. T2DM

bezeichnet [121–123]. In Folge kommt es zu mikro- und makrovaskulären Komplikationen wie Retinopathien, Polyneuropathien, Glomerulosklerose, arterielle Verschlusskrankheit und Ischämien an Myokard und Gehirn. Ein T2DM erhöht das Risiko für diese Komplikationen [65,121]. Die kardiovaskulären Folgen machten im Jahr 2010 bis zu 43% und damit den größten

Teil der Todesfälle in Deutschland aus. Das metabolische Syndrom besitzt daher eine außerordentliche Bedeutung für vaskuläre Folgeerkrankungen.

1.5.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung

Bereits 1980 wurde von Fettlebererkrankungen berichtet, die nicht durch übermäßigen Alkoholkonsum begründet waren. Die Ursache hierfür war zunächst unklar, wird jedoch heute als Element des metabolischen Syndroms über eine viszerale Adipositas angesehen [124].

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) durchläuft mehrere Stadien, die sich histologisch klassifizieren lassen:

1. reine Fettleber (NAFL, *non-alcoholic fatty liver*, Steatosis hepatis) mit intrahepatischer Akkumulation von Lipiden,
2. nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH): NAFL mit entzündlichen Immunzellinfiltraten und beginnender Fibrose,
3. Mikronoduläre Leberzirrhose („Fettzirrhose“) [121,125,126].

NASH und Fettzirrhose erhöhen das Risiko für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms, eines Diabetes mellitus, kardiovaskulärer Erkrankungen und erhöhter Sterblichkeit eines Organismus [121,125,126].

In westlichen Industrienationen hat die NAFLD heute eine Inzidenz von mehr als 30 %, wobei in 10 - 25 % der Fälle schon eine NASH vorliegt. In der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus wird die NASH als ein wesentlicher Faktor für die Entwicklung einer Insulinresistenz und Sekretionsstörung der Betazellen angesehen [127]. Medikamente, Morbus Wilson oder parenterale (Fehl)Ernährung spielen als Ursachen eine untergeordnete Rolle [121,126].

1.6 Tiermodell

Es war das Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung der definierten mtDNA-Mutation für den Glucosestoffwechsel, die Generierung von ROS und mitohormetische Prozesse im Verlauf der Alterung zu charakterisieren.

Hierzu wurden die conplastischen Mausstämme C57BL/6NTac-mt^{ALR/LtJ} (ALR) und C57BL/6NTac-mt^{AKR/J} (AKR) als Modell eingesetzt. Ein conplastischer Mausstamm vereint in einer Zelle das nukleäre Genom eines Stammes mit dem mitochondrialen Genom eines anderen Stammes [128]. So besitzen die in dieser Arbeit untersuchten Mausstämme das nukleäre Genom des B6-Stammes, jedoch unterschiedliche mitochondriale Genome (ALR/LtJ und AKR/J) mit Mutationen im OXPHOS-System. Conplastische Mausstämme wurden durch Verpaarung weiblicher Tiere des mitochondrialen Donorstammes (z.B. ALR/LtJ) mit männlichen Tieren

des C57BL/6NTac-Stammes als nukleären Hintergrund erzeugt. Anschließend wurden die weiblichen Nachkommen auf Männchen des C57BL/6NTac-Stammes zurückgekreuzt. Nach mindestens 10 Rückkreuzungen wurde der Stamm als conplastisch betrachtet und konnte für die Untersuchung genutzt werden (Abb. 1.10) [129].

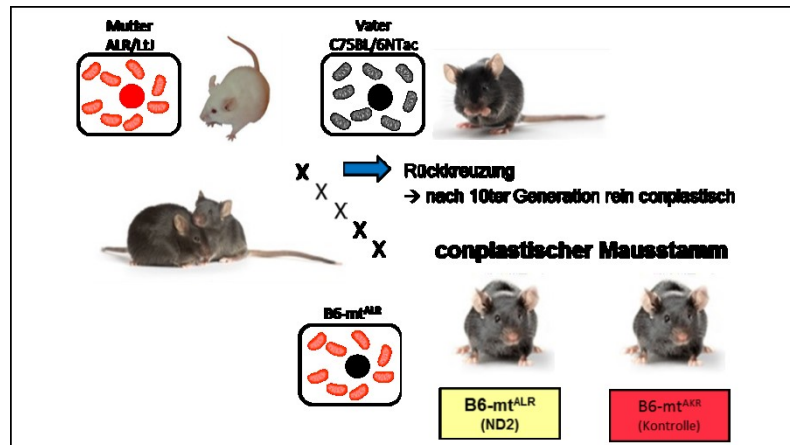


Abb. 1.10: Erzeugung conplastischer Mausstämme [129]

Weibchen des mitochondrialen Donorstammes (ALR/LtJ) wurden mit Männchen des nukleären Donorstammes (C57BL/6NTac) gekreuzt. Die weiblichen Nachkommen wurden daraufhin mindestens 10 Mal mit den Männchen des Donorstammes zurückgekreuzt.

Das mitochondriale Genom des ALR-Mausstammes ist gekennzeichnet durch einen Polymorphismus in der transmembranen Untereinheit mtND2 des Komplex I der Atmungskette. Dieser Polymorphismus wird durch den Austausch der Basen Cytosin durch Adenin und damit der Aminosäuren Methionin durch Leucin bedingt.

Bisher war es unmöglich einen einzelnen Genpolymorphismus der mtDNA zu untersuchen. Mithilfe der Entwicklung conplastischer Mausstämme können diese Genpolymorphismen und ihre Effekte auf den Zellstoffwechsel und die Alterung nun genau charakterisiert werden. Dadurch ist es auch möglich weitere Erkenntnisse über humane Erkrankungen, die durch eine mitochondriale Mutation begründet sind, zu gewinnen [128].

Durch den Vergleich der conplastischen Mausstämme in dieser Arbeit konnten störende Einflüsse durch Unterschiede in der nukleären DNA durch Genomanalysen ausgeschlossen werden [129]. Außerdem konnten durch identische Lebensbedingungen exogene Faktoren, die zum Altern eines Organismus führen (wie z.B. Nahrungsangebot, Stress oder Tod durch Fressfeinde) [12], eliminiert bzw. standardisiert werden.

1.7 Zielstellung

Studien an Tieren und Menschen belegten bereits, dass mitochondriale Fehlfunktionen während der Alterung sowie bei altersassoziierten Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen könnten [33]. Die Analyse mitochondrialer Dysfunktionen kann daher zu neuen Erkenntnissen im Hinblick auf den Alterungsprozess und altersbedingte Erkrankungen führen. Mitochondriale Dysfunktionen können unter anderem infolge von Mutationen des mitochondrialen Genoms entstehen. Dieses ist im Vergleich zum nukleären Genom nicht durch Histone geschützt, besitzt ein weniger gut ausgebildetes Reparatursystem und kann leicht durch Superoxidanionen, welche in der mitochondrialen Atmungskette gebildet werden, geschädigt werden. Daher ist die Untersuchung der Auswirkungen von Mutationen der mtDNA besonders interessant.

Genmutationen, welche allein auf der mtDNA zu finden sind, ließen sich bisher allerdings nur schwer untersuchen. Durch die Entwicklung und den Einsatz conplastischer Mausstämmen (1.6) ist es nun jedoch möglich Mutationen des mitochondrialen Genoms und ihre Auswirkungen auf einen Organismus isoliert zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mausstamm B6-mt^{ALR} (ALR) mit einer homoplastischen Mutation im *ND2*-Gen des Komplex I der Atmungskette im Vergleich zu dem conplastischen Kontrollmausstamm B6-mt^{AKR} (AKR) untersucht, der diese Mutation nicht aufwies. Da Dysfunktionen des mitochondrialen Elektronentransfers zu einer beschleunigten Alterung in stoffwechselaktiven Organen wie der Leber führen können, war es Ziel dieser Dissertation den Effekt dieser Mutation im ALR-Mausstamm auf Stoffwechselparameter und das Lebergewebe im Verlauf der Alterung zu untersuchen. Der Untersuchungszeitraum belief sich auf 24 Monate, was ungefähr einem Alter von 80 Jahren bei Menschen entspricht.

Folgende Fragen sollten im Rahmen dieser Dissertation beantwortet werden:

1. Welche Effekte hat die *ND2*-Mutation auf die Gewichts- und Blutzuckerentwicklung im Verlauf der Alterung?
2. Welchen Einfluss hat die *ND2*-Mutation auf die mitochondriale Superoxidanionen-Bildung während der Alterung?
3. Wie äußert sich die *ND2*-Mutation im Hinblick auf den alterungsabhängigen Verlauf der Kopienzahl des mitochondrialen Genoms (Lebergewebe)?
4. Welchen Einfluss hat die *ND2*-Mutation auf die Genexpression der, für den mitochondrialen Stoffwechsel relevanten, Proteine *ND2* und *TFAM* (Lebergewebe)?
5. Wie verändert sich die Genexpression der oxidativen Verteidigung (*SOD1*, *SOD2*, Katalase und *UCP2*) durch den *ND2*-Polymorphismus?

6. Welchen Effekt hat die *ND2*-Mutation auf die Gen- und Proteinexpression der metabolisch relevanten Proteine mTOR, Histone und p53 (Lebergewebe)?
7. Welchen Einfluss hat die *ND2*-Mutation auf die Proteinexpression von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (Lebergewebe)?
8. Welchen Einfluss hat die *ND2*-Mutation auf die altersabhängige Adaptation des Immunsystems (Leukozyten, Lymphozyten, Neutrophile, Eosinophile)?

Die Daten sollten Alterszeitpunkte herausarbeiten, in denen die *ND2*-Mutation Unterschiede in der ROS-Generierung, der Expression der Atmungskettenkomplexe und mitohormetischen Adaptation zeigt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.1: Chemikalien und Reagenzien

Hersteller	Reagenz
Bio Rad Laboratories GmbH, München	Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml), Precision Plus Protein™ All Blue Standards #161-0373
BioTeZ, Berlin	Hexadimer-Primer
Calbiochem (Merck), Darmstadt	NP-40
Carl Roth, Karlsruhe	Acrylamid, Tween® 20, Tetramethylethylendiamin (TEMED), Tris; Glycin
Gibco, Carlsbad, USA	TBE-Puffer
Invitrogen, Carlsbad, USA	Superscript II Reverse Transkriptase, MitoSOX™ Red Mitochondrial superoxide indicator for live-cell imaging (Katalognummer M36008), 5-fach First-Strang Puffer®, 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)
LI-COR, Bad Homburg	Odyssey-Blocking-Puffer
Merck, Darmstadt	Phenol; Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
MP Biomedicals, Eschwege	ReadyRed Chloroform-Isoamylalkohol
PAA, Cölbe	Bovines Serumalbumin (BSA), PBS
Peqlab, Erlangen	peqGOLD Universal Agarose, Desoxynukleotidtriphosphat-Mix
Promega, Mannheim	DNA Ladder (1 kb), RNase Inhibitor (Rnasin® Plus)
Qiagen, Hilden	Nuklease-freies Wasser, SYBR Green Mastermix®
Satura, Staufen	Kryomatrix, Kryomatrixschälchen
Serva, Heidelberg	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Sigma-Aldrich, Hamburg	2-Mercaptoethanol, Phosphoenolpyruvat, Ammoniumpersulfat (APS, 10%), Bromphenolblau, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Isopropanol, Natriumchlorid, Tris-HCl, Natriumdesoxycholsäure
Zentralapotheke, Rostock	Ethanol (70%), Ethanol (96%)

2.1.2 Kits

Tab. 2.2: Kits

Hersteller	Kit
Applied Biosystems, Foster City, USA	TaqMan universal PCR Master Mix
Carl Roth, Karlsruhe	Roti®-Quant (Bradford-Reagenz)
Merck, Darmstadt	NovaQUANT™ Mouse Mito. To Nuclear Ratio Kit
QIAGEN, Venlo, Niederlande	Dnase-Kit (On-Column Dnase Digestion mit Rnase-Free Dnase Set), Rneasy® Mini Kit (250), QIAmp DNA Mini Kit

2.1.3 Methodenspezifische Sonden und Antikörper

Tab. 2.3: Methodenspezifische Sonden (Taqman) und Antikörper

Taqman®-Sonde	Katalognummer	Spezies	Herkunft
Katalase (Cat)	Mm01340247_m1	Maus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	Mm99999915_g1	Maus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)	Mm00444968_m1	Maus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A (TFAM)	Mm00447485_m1	Maus	Applied Biosystems, Foster City, USA
NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase Subunit 2 (ND2)	Mm04225288_s1	Maus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Superoxiddismutase 1 (SOD1)	Mm01700393_g1	Maus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Superoxiddismutase 2 (SOD2)	Mm00690588_m1	Maus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Uncoupling proteine 2 (UCP2)	Mm00627599_m1	Maus	Applied Biosystems, Foster City, USA
16SrRNA (RNR2)	Mm04260181_s1	Maus	Thermo Scientific, Waltham, USA
β-Actin	4970	Human, Maus, Ratte	Cell Signaling, Danvers, USA
β-Actin (C4)	sc-47778	Human, Maus, Ratte	Santa Cruz, Dallas, USA
Histone H2A.X	2577	Human, Maus, Ratte	Cell Signaling, Danvers, USA
MitoProfile® Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail	ab110413	Human, Maus, Ratte, Rind	Mitosciences, Eugene, USA
p53 (1C12)	2524	Human, Maus, Ratte	Cell Signaling, Danvers, USA

2.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 2.4: Verbrauchsmaterial

Hersteller	Material
Applied Biosystems, Darmstadt	MicroAmp™ Optical Adhesive Film
Bio Rad Laboratories GmbH, München	Agarosegel-Mini-Kammern
Carl Roth, Karlsruhe	Spritze, Kanülen
Engelbrecht, Edermünde	Objektträger (76 x 26 mm), Deckgläschen (22 x 22 mm)
Eppendorf, Hamburg	Eppendorfgefäß (1,5 und 2 ml)
Millipore, Schwalbach am Taunus	PVDF Transfer Membran
MP Biochemicals, Eschwege	Säulen Lysing Matrix D
MP Biomedicals, Eschwege	QIAshredder Mini Spin Columns

Nerbe plus, Winsen/ Luhe Sarstedt, Nümbrecht ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest	96-well-PCR-Platte, Verschlussfolie für qRT-PCR Multiply®-µStrip Kette (0,2 ml), Multiply® 8er Deckelkette (flach), Küvetten, EDTA-Röhrchen ssniff® R/M-H
---	--

Tab. 2.5: Chirurgisches Besteck

Hersteller	Besteck
Aesculap, Tuttlingen	Anatomische Pinzette, chirurgische Pinzette, gebogene Schere, gerade Schere, Skalpell

2.3 Geräte

Tab. 2.6: Geräte

Hersteller	Gerät
Abbott, Wiesbaden	Glucometer Free Style Mini
AHF Analysetechnik, Tübingen	DAPI/TRITC Tripleband HC Filterset
Amersham Bioscience, Freiburg im Breisgau	Photometer Ultrospec 2100 pro
Applied Biosystems, Darmstadt	7900HT FAST Real-Time PCR System
Bio Rad Laboratories GmbH, München	Agarose-Gelelektrophorese-Kammer, Trans-Blot® Semi-Dry, SDS-PAGE Gelelektrophorese Kammer
Bosch, Gerlingen	Eisschrank
C.B.S. Scientific, USA	Spannungsquelle EPS-250
Elektrolux, Stockholm, Schweden	Kühlschrank
Eppendorf, Hamburg	Mikropipetten, Pipettenspitzen
Gilson, Middleton, USA	Mikropipetten, Pipettenspitzen
Greier, Frickenhausen	Petrischalen
Heidolph Instruments, Schwabach	Vortexer, Schüttler
Hettich, Tuttlingen	Zentrifuge Mikro 200R
IKA, Staufen	Homogenisator ULTRA-TURRAX
Leica, Nussloch	Mikrotom RM 2235
LI-COR, Bad Homburg	Odyssey Infrared Imager
Liebisch, Bielefeld	Thermoblock
Moulinex Compact, Offenbach/ Main	Mikrowelle
Olympus, Tokio, Japan	60x 1,35 UPCSAPÖ Ölimmersions Objektiv, Fluoview FV10i, Excellence®-Fluoreszenzmikroskop System
Peqlab, Erlangen	Zentrifuge Perfect Spin P
Sartorius, Göttingen	Waage
Sartorius, Göttingen	Laborwaage Omnilab
Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien	Eismaschine
SensoQuest, Göttingen	Labcycler
Siemens, Berlin/ München	Wasseraufbereitungsanlage
Siemens, Eschborn	ADVIA 2120
Thermo Scientific, Waltham, USA	NanoDrop 2000 Spectrophotometer
UniEquib, Martinsried	Dual Intensity Transilluminator

2.4 Software

Tab. 2.7: Software

Hersteller	Software
Applied Biosystems, Darmstadt	SDS 2.3/ SDS RQ-Manager 1.2
GraphPad Software, La Jolla, USA	GraphPad Prism 5
Media Cybernetics, Rockville, USA	AutoQuant X image Deconvolution Software 2.2.1
Microsoft, Redmond, USA	Microsoft Excel 2010
Olympus, Tokio, Japan	FV10-ASW 2.0
ProteinSimple, Santa Clara, USA	AlphaView
Siemens, Eschborn	Software ADVIA2120
Thermo Scientific, Waltham, USA	NanoDrop 2000/ 2000c

2.5 Methoden

2.5.1 Versuchstiere

Die während dieser Arbeit untersuchten conplastischen Mausstämme sind in der Tab. 2.8 gelistet. Sowohl der Mutationsstamm C57BL/6NTac-mt^{ALR/LtJ} als auch der Kontrollstamm C57BL/6NTac-mt^{AKR/J} entstanden durch Kreuzungen eines weiblichen mitochondrialen Donorstamms mit Männchen des C57BL/6Ntac-Stammes als nukleären Hintergrund [129–131]. Anschließend wurden die weiblichen Nachkommen mit den Männchen des C57BL/6NTac-Stammes zurückgekreuzt. Nach mindestens 10 Backcross-Generationen wurde der Stamm als conplastisch betrachtet und konnte für die Untersuchung genutzt werden [129].

Tab. 2.8: Conplastische Mausstämme [129]

Stamm	mtDNA-Varianten	Gen/ Aminosäurenaustausch	Backcross-Generation
C57BL/6NTac-mt ^{AKR/J}	9A	Kontrollstamm	18
C57BL/6NTac-mt ^{ALR/LtJ}	nt4738-9A C/A	mtND2 (Komplex I) Leu-Met	10

Aus Gründen der Vereinfachung werden im Folgenden der Mausstamm C57BL/6NTac-mt^{ALR/LtJ} als ALR und der Kontrollstamm C57BL/6NTac-mt^{AKR/J} als AKR bezeichnet.

2.5.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden in der zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock in Polycarbonat-Käfigen vom Typ II (360 cm²) in Kohorten von je vier Tieren gehalten. Dabei betrug die Raumtemperatur 20 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit 50 ± 5 %. Die Beleuchtung wurde auf einen 12-Stunden-Rhythmus eingestellt. Gemäß den Empfehlungen der Federation

for Laboratory Animal Science Associations (FELASA) wurden die Tiere regelmäßig auf murine Pathogene untersucht.

Die Mäuse erhielten eine Standarddiät (9 % kcal als Fett; sniff® R/M-H), bei der sowohl Futter als auch Wasser stets frei zugänglich waren. Die Tötung erfolgte unter Narkose mittels zervikaler Dislokation im Lebensalter von 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten. Ausgewählte Organe (Milz, Pankreas, Muskel, Fett und Gehirn) wurden gemäß § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 des Tierschutzgesetzes entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Die Untersuchungen wurden im Rahmen eines Tierversuchsvorhabens durchgeführt, dass durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) genehmigt wurde.

2.5.3 Bestimmung des Körpergewichts

Das Körpergewicht der Mäuse wurde jeweils nach 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten mit Hilfe einer Laborwaage bestimmt.

2.5.4 Bestimmung der Blutzuckerkonzentration

Zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration wurde die Schwanzspitze der Mäuse mit einem Skalpell eingeritzt und ca. 0,3 µl Blut entnommen. Die Messung des Glukosespiegels erfolgte mit einem Glukosemessgerät nach der Glukoseoxidase-Methode im Alter von 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten. Die Messungen wurden in den Vormittagsstunden zwischen 9 und 12 Uhr durchgeführt. Ab einer Serumglukosekonzentration von 9 mmol/l liegt bei Mäusen ein Diabetes mellitus vor.

2.5.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels MitoSOX

MitoSOX™ Red ist ein hochselektiver Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion von mitochondrial gebildeten O_2^- [132]. Dabei ist MitoSOX™ ein kationisches Derivat von Dihydroethidium (=Hydroethidin, HE), welches in die Mitochondrien diffundiert, wo es durch O_2^- oxidiert wird. Das entstandene 2-Hydroxyethidium zeigt nach Bindung an Nukleinsäuren eine Fluoreszenz, die mikroskopisch detektiert werden kann. Der Farbstoff hat ein Anregungsmaximum von 400 nm und ein Emissionsmaximum von 590 nm.

Da der Nachweis nur in lebenden Zellen möglich ist, erfolgte eine Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs am lebenden Tier. Dazu wurden 25 µg MitoSOX in 6,5 µl Dimethylsulfoxid gelöst und mit 1x PBS-Puffer auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde den Tieren zu definierten Alterszeitpunkten (3, 6, 9, 12, 18, 24 Monate) i.p.

injiziert. Nach 1 h erfolgte die Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation. Auf eine Narkose wurde verzichtet, um einen Einfluss auf die ROS-Produktion auszuschließen. Anschließend wurden die zu untersuchenden Organe entnommen, in Kryomatrix eingebettet und bei -70 °C gelagert.

Alle Verfahren wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) genehmigt (Tierversuchsnummer 7221.3-1.1-061/10). Aus dem in Kryomatrix -eingebetteten Lebergewebe wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Weiterhin erfolgte eine Färbung mit DAPI zur Darstellung der DNA in den Zellkernen. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop Fluoview FV10 und einem 60 x 1,35 UPCSAPÖ Ölimmersions Objektiv visualisiert. Das 2-Hydroxyethidium wurde dabei mittels eines 559 nm LD-Lasers angeregt und emittierte Strahlung der Wellenlänge 578 nm gemessen.

Die Visualisierung am Mikroskop erfolgte mittels der Software FV10-ASW 2.0 nach folgenden Parametern:

- Farbstoff: DAPI (49,6 %, Laser 405 nm) und TRITC (49,6 %, Laser 559 nm),
- Phase contrast: 36,6 %,
- Image size: 1024 x 1024,
- Speed and quality (average): high quality (x 16),
- confocal aperture x 1.0,
- suchen eines geeigneten Präparatausschnittes mit dem 10er Objektiv,
- Fotoaufnahme mit dem 60er Objektiv (5 Bilder pro Gewebeschnitt).

Die quantitative Auswertung der Bilder wurde mit Hilfe der AutoQuant X Software durchgeführt. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität der Bildpixel bestimmt. Die Fluoreszenzintensität hat eine dimensionslose Größe von 0 bis 4095. Um Hintergrundfluoreszenzen zu eliminieren, wurde ein Grenzwert für die Fluoreszenzintensität von 500 festgelegt. Pro Bild wurde daraufhin der Prozentsatz pro Pixel bestimmt, deren Fluoreszenzintensität höher als 500 war.

2.5.6 Genexpression

2.5.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits. Dazu wurden 30 mg Lebergewebe in einem Puffer (500 µl, 1 % Mercaptoethanol) lysiert und für 15 s bei 500 rpm homogenisiert. Zur Trennung der RNA von Proteinen und DNA wurde das Gemisch

in QIAshredder Mini Spin Columns überführt und im Vakuum-Homogenisator zentrifugiert (2 min, 12000 rpm). Nach dem Abnehmen der oberen wässrigen Phase wurde die RNA mit 70 %igem Ethanol (500 µl) gefällt. Anschließend wurden 700 µl des RNA-Ethanol-Gemisches auf eine Silica-Membran-Säule aufgetragen. Durch den zugehörigen Hochsalzpuffer erfolgte die Bindung der RNA an die Membran. Danach schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an (15 s, 12000 rpm) und die überstehenden Proteine wurden verworfen. Nachfolgend wurde die Säule zweimalig mit RW-Puffer (500 µl) gewaschen und erneut zentrifugiert (20 s, 12000 rpm). Es folgte ein DNA-Verdau mittels eines DNase-Kits, um die Probe möglichst vollständig von genomischer DNA zu befreien. Dazu wurde DNase-Lösung (10 µl) mit RDD-Puffer (70 µl) gemischt, auf die Säule gegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Mehrmaliges Waschen durch verschiedene Puffer führte zur Aufreinigung der RNA: einmalig mit RW-Puffer (500 µl, 15 s, 12000 rpm), zweimalig mit Ethanol versetztem RPE-Puffer (500 µl, 15 s, 12000 rpm). Anschließend wurde die Säule auf ein Auffanggefäß gesetzt und durch Zentrifugation getrocknet (2 min, 12000 rpm). Abschließend wurde die RNA in Nuklease-freiem Wasser (100 µl) gelöst, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und die RNA durch Zentrifugation eluiert (2 min, 12000 rpm). Die RNA befand sich danach im Überstand und konnte in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt werden.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch am Nanodrop ermittelt. Durch das Verhältnis der Lichtabsorption bei verschiedenen Wellenlängen (230 nm zu 260 nm bzw. 260 nm zu 280 nm) konnte der Reinheitsgrad der isolierten RNA bestimmt werden.

2.5.6.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe der reversen Transkriptase (RNA-abhängige-DNA-Polymerase). Zur Synthese der cDNA benötigt die reverse Transkriptase ein DNA-Oligonukleotid (Hexamer), welches dem Enzym den Startpunkt anzeigt. Die reverse Transkriptase kann daraufhin weitere komplementäre Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTP's) an die RNA-Matrize anlagern, sodass ein doppelsträngiges RNA-DNA-Hybrid entsteht. Die reverse Transkriptase besitzt zusätzlich RNase H-Aktivität, die zur Degradation von RNA führt. Der RNA-Anteil des entstandenen Hybrids wird abgebaut, sodass der synthetisierte DNA-Einzelstrang als Matrize für die Synthese weiterer DNA-Stränge dienen kann. Die cDNA-Synthese wurde mit prozessierter RNA, also RNA die nur Exons und keine Introns enthält, durchgeführt. Die gebildete cDNA kann weiter für die qRT-PCR (2.5.6.3) verwendet werden.

Für die cDNA-Synthese wurde von den Gewebeproben je 200 ng RNA eingesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz nach folgendem Schema auf Eis pipettiert:

Tab. 2.9: Reaktionsansatz cDNA-Synthese

Reagenz	Menge
5-fach First-Strang Puffer®	5 µl
Dithiothreitol	1 µl
dNTP-Mix	8 µl
Hexadimer-Primer (100 pmol)	1,5 µl
Nuklease-freies-Wasser	6,75 µl
RNasin plus®	0,5 µl
RNA-Template (200 ng)	1 µl
Superscript II®	1,25 µl

Die Synthese erfolgte bei 42 °C für 116 min im Thermocycler. Anschließend wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

2.5.6.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Um die mRNA-Expression zu quantifizieren wurde die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) mittels TaqMan®-PCR-Technologie verwendet. Grundlage dieser Methode ist die Kombination aus reverser Transkriptase und der Polymerase-Kettenreaktion. Für dieses Verfahren wurden spezifische TaqMan®-Sonden generiert. Dies sind Oligonukleotid-Sonden mit folgenden Charakteristika:

- nicht fluoreszierender 3'-Quencher-Farbstoff
- fluoreszierender 5'-Reporter-Farbstoff
- 3'-minor groove binder (MGB)

Die zu untersuchende cDNA wird zunächst durch Erhitzen im Thermocycler in zwei Einzelstränge (Denaturierung) aufgetrennt. Dann lagern sich spezifische Primer an die komplementäre Sequenz der cDNA (Annealing) an. Auch die verwendeten Taqman-Sonden binden an ausgewählte komplementäre Basenfolgen am Zielgen (Target-DNA) in der Nähe des Primers. Sofern die Sonde dabei einzeln oder an den DNA-Strang gebunden vorliegt, kann kein Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs detektiert werden. Grund dafür ist dessen Unterdrückung durch den benachbarten Quencher-Farbstoff. Es folgt die Elongation des cDNA-Stranges über die hinzugegebenen DNA-Bausteine (Gemisch aus Desoxynukleosid-Triphosphaten) durch die DNA-Polymerase. Die verwendete Taq-DNA-Polymerase verfügt neben ihrer Polymerase-Aktivität auch über eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Dies führt während der Synthese des komplementären Stranges zum Abbau der TaqMan-Sonde am 5'-Ende und zur Trennung von Quencher und Fluorophor. Es kommt somit zu einer Steigerung

der Reporter- Fluoreszenz, die am Ende der Elongation, in der exponentiellen Phase der PCR, in jedem Zyklus gemessen werden kann. Hierbei korreliert die gemessene sequenzspezifische Intensität der Fluoreszenz proportional mit der Quantität des Amplikons [133,134].

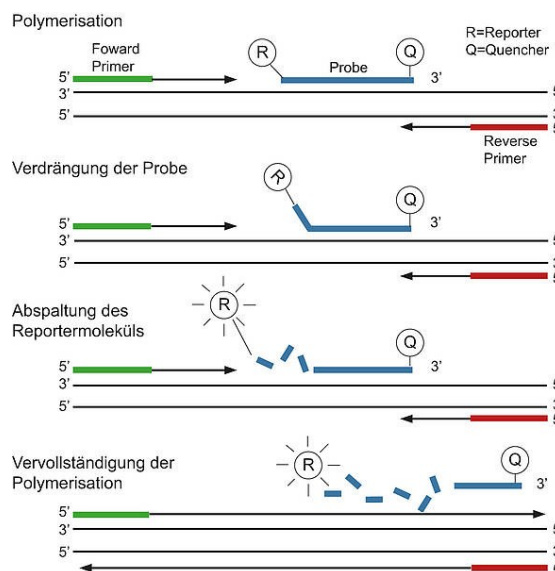


Abb. 2.1: Schema zum Ablauf der quantitativen real time PCR (www.medizinische-genetik.de/index.php?id=8688)

Die TaqMan-Sonde (in der Abbildung als Probe bezeichnet) bindet an eine Zielsequenz zwischen den *forward*- und *reverse* Primern. Dabei enthält die Sonde am 5'-Ende einen Quencher- und am 3'-Ende einen Reporter-Farbstoff. Befinden sich diese beiden in räumlicher Nähe zueinander wird die Fluoreszenz supplimentiert. Im Verlauf der PCR verdrängt die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase die Sonde vom 5'-Ende her. Reporter und Quencher werden voneinander getrennt, die Fluoreszenz des Reporters wird nicht mehr supplimentiert und kann detektiert werden. Die Intensitätszunahme der Reporter-Fluoreszenz ist proportional zur Entstehung von PCR-Produkten.

Zur Untersuchung der Genexpression des mitochondrialen Gens *ND2* wurde in dieser Arbeit die mitochondriale 16S-rRNA als Housekeepinggen verwendet. Für alle weiteren Expressionsanalysen wurde das Gen der ubiquitär vorkommenden *Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase* (*GAPDH*) als Referenz genutzt. Der PCR-Ansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tab. 2.10: Ansatz für PCR

Reagenz	Menge
Nukleasefreies Wasser	8 µl
Taqman Mastermix	10 µl
Taqman-Sonde	1 µl

Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf eine 96-well-PCR-Platte übertragen (19 µl pro well) und dem Ansatz 1 µl cDNA zugegeben. Für die Detektion erfolgte die Durchführung der Quantitativen real time PCR im 7900HT FAST Real-Time PCR System unter folgendem Programm:

Tab. 2.11: PCR-Zyklen bei der real time PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95 °C	10 min	1
2	95 °C	15 s	40
3	60 °C	1 min	40

Die PCR ist mit dem SDS 2.3-Programm erstellt und mit dem RQ-Manager ausgewertet worden. Die quantitative Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Der C_T -Wert (cycle threshold) ist eine theoretische Größe, die das erstmalige signifikante Übersteigen der Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz beschreibt. Als Referenzgen, um etwaige Variationen der mRNA auszugleichen, dienten 16SrRNA und *GAPDH*. Der C_T -Wert des Referenzgens wurde vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (ΔC_T). Durch die Ermittlung der Expressionsänderung einer Zielsequenz der Probe relativ zur gleichen Zielsequenz der Kontrolle konnte abschließend $\Delta\Delta C_T$ bestimmt werden.

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Probe}} - \Delta C_{T \text{ Kontrolle}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

2.5.7 Bestimmung der mitochondrialen DNA

2.5.7.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kits. Zunächst wurden 15 mg Lebergewebe in einem Eppendorfgefäß abgewogen, mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K gründlich vermischt und bei 56 °C in einem rotierenden Inkubator für 1 bis 3 h inkubiert, bis eine homogene Suspension entstand. Die Proteinase K führte zum Abbau von Proteinen und der Freisetzung von Nukleinsäuren. Die Puffer dieser Methode dienen zum einen der Stabilisierung der DNA, zum anderen der Denaturierung der Proteine. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Zugabe von 4 µl RNase A (100 mg/ml), um vorhandene RNA aus dem Nukleinsäuregemisch zu entfernen. Der Ansatz wurde gründlich gemischt, bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Danach wurden 200 µl AL-Puffer zugegeben, 15 s gevortext und 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Zur Fällung der DNA wurden dem Reaktionsansatz 200 µl Ethanol (96 %ig) zugegeben. Erneut wurde 15 s gevortext und zentrifugiert. Danach wurde das Gemisch in eine QIAamp-Säule mit einem 2-ml-Auffanggefäß überführt und erneut zentrifugiert (1 min, 8000 rpm). Die Auffangssäule enthielt eine Silica-Membran, an die die DNA gebunden wurde. Es folgten mehrere Waschschrte mit verschiedenen Puffern. Im ersten

Schritt wurden 500 µl AW1-Puffer zugeführt und zentrifugiert (1 min, 8000 rpm). Im zweiten Schritt wurden 500 µl AW2-Puffer zugegeben und wiederum zentrifugiert (3 min, 14000 rpm). Anschließend wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt, 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert und in ein Eppendorfgefäß gestellt. Zur Elution der DNA wurden 25 µl AE-Puffer auf die Säulenmembran pipettiert, 1 min inkubiert und zentrifugiert (1 min, 8000 rpm). Dieser Schritt wurde insgesamt dreimalig wiederholt, da sich dadurch eine höhere Ausbeute erzielen ließ. Die Menge an DNA wurde abschließend am NanoDrop-Photometer bestimmt. Das Prinzip gleicht der Isolierung von Gesamt-RNA.

2.5.7.2 Agarosegelelektrophorese [135]

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese konnte der Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäure (2.5.7.1) überprüft werden, um auszuschließen, dass Verunreinigungen im weiteren Verlauf der Versuche falsche Ergebnisse hervorrufen.

Zum Herstellen der 1,2 %igen Agaroselösung wurde eine entsprechende Menge Agarose mit TBE-Puffer gemischt und für 2 - 3 Minuten erwärmt bis eine homogene Lösung entstanden ist. Das Einstellen des TBE-Puffers auf einen pH-Wert von 8,0 erfolgte mit NaOH. Der TBE-Puffer diente der Erhaltung eines konstanten pH-Wertes und dem Vorliegen der Nukleinsäure als Polyanion, sodass alle Nukleinsäurefragmente während der Elektrophorese von der Kathode zur Anode wandern. Die handwarme Lösung wurde anschließend in einen Gelschlitten gegossen und zusätzlich 5 µl Ethidiumbromid in die Lösung gegeben. Dieses interkaliert mit der Nukleinsäure und ermöglicht dadurch deren Visualisierung.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA in einem horizontalen Agarosegel fand in Agarosegel-Mini-Kammern statt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 Vol. 6 x Loading Dye versetzt, um ein möglichst vollständiges Einsinken in die Taschen und eine Markierung der Lauffront zu gewährleisten. Für eine anschließende Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente fanden 5 µl eines 1 kb Größenstandards Verwendung. Die Gelelektrophorese erfolgte 1 h bei einer konstanten Spannung von 70-90 V unter Verwendung von 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer. Die Nukleinsäuren konnten bei einer Wellenlänge von 254 nm mit Hilfe eines Transilluminators in einer Photodokumentationsanlage visualisiert und dokumentiert werden.

2.5.7.3 Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl

Für die Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl wurde das NovaQUANT Mouse Mitochondrial to Nuclear DNA Ratio Kit[®] verwendet. Dieses enthielt eine vorgefertigte 96-well-Platte, auf

deren Kavitätenboden bereits vier verschiedene Primer aufgebracht waren. Von diesen Primern entsprachen trLEV und 12S mitochondrialen und BECN1 und NEB nukleären Genen. Des Weiteren waren im Kit eine Positiv- und eine Negativkontrolle enthalten. Mit Hilfe einer qRT-PCR wurden anschließend vielfache Kopien hergestellt und die C_T -Werte ermittelt. Die C_T -Werte der Kontrollen konnten mit den Herstellerangaben verglichen werden. So war es möglich den qRT-PCR-Erfolg zu kontrollieren. Für die qRT-PCR wurde der DNA SYBR® Green Mastermix verwendet. Der Farbstoff SYBR® Green interkaliert mit der DNA, sodass nach dem Einbau in doppelsträngige DNA ein Signal detektierbar ist. Die Höhe der Signalstärke korreliert mit der Konzentration der DNA in Lebergewebe.

Die isolierte DNA wurde mit einer Endkonzentration von 5 ng/μl in die 96-*well*-Platte vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe des SYBR® Green Mastermixes und Nuklease-freien Wassers. Die Reaktionsansätze wurden nach folgendem Schema auf Eis pipettiert:

Tab. 2.12: Pipettierschema für einen Reaktionsansatz

Reagenz	Menge
Verdünnte DNA (5 ng/μl)	1,84 μl
Nuklease-freies Wasser	44,16 μl
SYBR® Green Mastermix	46 μl

Pro *well* wurden 20 μl eines Ansatzes aufgetragen, sodass jede Probe mit jedem der vier Primer reagieren konnte. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt wurde die qRT-PCR gestartet. Diese erfolgte mittels 7900HT FAST Real-Time PCR System nach folgendem Programm:

Tab. 2.13: PCR-Programm für die Ermittlung der mtDNA-Kopienzahl

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
1	95	10 min	1
2	95	15 s	40
3	60	1 min	40

Die mittlere mtDNA-Kopienzahl einer Zelle wurde folgendermaßen berechnet:

$$\Delta C_{TA} = C_T(BCN1) - C_T(trLEV)$$

$$\Delta C_{TB} = C_T(NEB) - C_T(12s)$$

$$mtDNA - Kopienzahl = \frac{2^{\Delta C_{TA}} + 2^{\Delta C_{TB}}}{2}$$

2.5.8 Proteinanalyse

2.5.8.1 Herstellung von zellfreien Lysaten

Für die Herstellung eines zellfreien Lysats aus der Leber wurde ca. 30 mg Gewebe verwendet. Dazu wurde das Lebergewebe in ein Homogenisationsgefäß überführt und 500 µl RIPA- (*Radioimmunoprecipitation assay*) Lysepuffer (Tab. 2.14) dazugegeben.

Tab. 2.14: Herstellung des RIPA-Lysepuffers

Reagenz	Menge
Natriumdesoxycholsäure	0,5 % (w/v)
NaCl	150 mM
NP-40	1 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Tris HCl (pH 8)	50 mM

Anschließend wurden die Proben im Homogenisator aufgeschlossen und das Gemisch in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Während der Ansatz für 30 min auf Eis inkubierte, wurde gelegentlich gevortext. Zur Trennung von unlöslichen Zellbestandteilen aus dem Lysat wurde abschließend zentrifugiert (10 min, 13000 rpm) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer Bestimmung der Proteinkonzentration (2.5.8.2) erfolgte die Lagerung der Proben bis zur Verwendung bei -20 °C.

2.5.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford [136]

Die aus dem Gewebelysat (2.5.8.1) gewonnenen Überstände wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration, falls nötig, mit Aqua dest. verdünnt. Jeweils 5 µl dieser Verdünnung wurden zu 200 µl Bradford-Reagenz Roti®-Quant (5-fach) gegeben und mit 795 µl Aqua dest. auf eine Gesamtmenge von 1000 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation der Ansätze von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Blindwert mit 5 µl Aqua dest. im Photometer. Hierzu wurden Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Durch eine mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichgerade wurde die Konzentration des Proteins in der Lösung im Bereich von 0 - 30 µg/ml errechnet.

2.5.8.3 SDS-PAGE [137]

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) dient der Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße. SDS und β -Mercaptoethanol führen dabei zur Aufspaltung der Tertiärstruktur. SDS lagert sich anschließend an negativ geladene Proteine an. Aufgrund der einheitlichen Ladung/ Masse-Verhältnisse und der negativen

Oberflächenladung der Proteine konnte die Auftrennung in Abhängigkeit von ihrer Größe erfolgen. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden ein Trenngel und ein Sammelgel verwendet. Dabei beruht die Trennung der Proteine zum einen auf der unterschiedlichen Porengröße des Polyacrylamidgels und zum anderen auf den verschiedenen pH-Werten im Sammel- und Trenngel. Die Porengröße ist dabei abhängig von der Polyacrylamidkonzentration.

Die SDS-PAGE erfolgte in Mini-Gelkammern, wobei Gele mit den Maßen 8,6 x 7,7 x 0,1 cm (Breite x Länge x Dicke) entstanden. Zur Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen verwendet:

Tab. 2.15: Herstellung des 4x Trenngelpuffers

Reagenz	Menge
H ₂ O _{dest.} ad.	100 ml
SDS (20% [w/v])	2 ml
Tris-HCl (pH 8,8)	18,2 g

Tab. 2.16: Herstellung des 4x Sammelgelpuffers

Reagenz	Menge
H ₂ O _{dest.} ad.	100 ml
SDS (20% [w/v])	2 ml
Tris-HCl (pH 6,8)	6,06 g

Tab. 2.17: Herstellung des 10x SDS-Laufpuffers

Reagenz	Menge
Glycin	144 g
H ₂ O _{dest.} ad.	1000 ml
SDS	10 g
Tris	30 g

Tab. 2.18: Herstellung der Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

Reagenz
Ammoniumpersulfat (w/v) 10%

Tab. 2.19: Herstellung des SDS-Probenpuffers

Reagenz	Menge
Bromphenolblau	0,2 g
DTE	4 ml
Glycin	20 ml
H ₂ O _{dest.} ad.	50 ml
SDS	4,6 g
Tris-HCl (pH 6,8)	12,5 ml

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in 12 % (v/v) Polyacrylamidgelen, wobei zur Beladung des Gels ein 5 %iges (v/v) Sammelgel verwendet wurde. Die Zusammensetzungen der Gellösungen sind in Tab. 2.20 dargestellt.

Tab. 2.20: Gelzusammensetzung für SDS-PAGE

Reagenz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
4x Sammelgelpuffer	0 ml	0,625 ml
4x Trenngelpuffer	4 ml	0 ml
Acrylamid-Lösung	4,25 ml	0,875 ml
APS (10 %)	120 µl	70 µl
H ₂ O _{dest.}	1,75 ml	3,5 ml
SDS (10 %)	108 µl	50 µl
TEMED	15 µl	10 µl

Zu Beginn wurde das Trenngel nach obigem Schema pipettiert und, nach Zugabe der APS-Lösungen, zwischen die mit Ethanol (70 % [v/v], vergällt) gereinigten und zusammengesetzten Glasplatten gegossen. Um eine gerade Gelkante zu gewährleisten, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol wurde nach dem Polymerisieren des Gels (ca. 30 min) mit Filterpapier abgenommen. In die noch flüssige Sammelgellösung erfolgte sofort nach Einfüllen zwischen die Glasplatten das Einsetzen des Kammes zur Taschenbildung. Verwendung fanden Kämme mit 10 Taschen, welche Volumina von 50 µl aufnehmen konnten. Nun wurde zu den Proteinproben SDS-Probenpuffer im Verhältnis 4:1 hinzugefügt, um danach die Proteine durch eine 5-minütige Inkubation bei 100°C zu denaturieren und abschließend das Gel mit den denaturierten Proteinen zu beladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben fand bei einer konstanten Spannung von 70 V (Sammelgel) bzw. 100 V (Trenngel) in 1x SDS-Laufpuffer bei Raumtemperatur statt, bis die Lauffront das Gelende erreichte. Für die Größenbestimmung der Proteine wurden 5 µl des „Precision Plus Protein™ All Blue Standard“ genutzt.

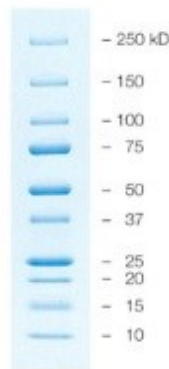


Abb. 2.2: Precision Plus Protein™ All Blue Standards #161-0373 (<http://www.bio-rad.com/en-us/sku/1610373-precision-plus-protein-all-blue-prestained-protein-standards>)

Der Proteinmarker ist ein Gemisch aus 10 rekombinanten, blau gefärbten Proteinen. Die angegebenen molekularen Massen entsprechen dabei den Herstellerangaben und bewegen sich zwischen 10 und 250 kDa. Zusätzlich existieren drei Referenzbanden bei 25, 50 und 75 kDa. Mithilfe dieses Proteinmarkers konnte die Größe der isolierten Proteine bestimmt werden.

2.5.8.4 Western blot Analyse

Zur spezifischen Untersuchung von Proteinen in einem Proteingemisch wurden diese nach der Auftrennung in der SDS-Page (2.5.8.3) mittels *semidry* Blot-Technik auf eine PVDF-Membran übertragen. Dies erfolgte durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (140 mA, 1 h) vertikal zur Laufrichtung des Elektrophoresegels. Durch Hybridisierung mit einem entsprechenden Antikörper konnten die Proteine auf der PVDF-Membran visualisiert werden. Zunächst wurde zur Blockierung von unspezifischen freien Proteinbindungsstellen die PVDF-Membran 1 h auf einem Schüttler mit Odyssey-Blocking-Puffer (Verdünnung 1:3) inkubiert. Anschließend wurde der Puffer verworfen und es folgte die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C in einer nach Herstellerangaben entsprechenden Verdünnung in 10 ml Odyssey-AK-Puffer (Verdünnung 1:3, 0,1 % Tween 20). Nach dreimaligem Waschen (1 x PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20) der Membran für 10 min wurde ein sekundärer Fluoreszenz-markierter Antikörper zugegeben. Dazu wurde 2 µl des sekundären Antikörpers in 10 ml Odyssey-AK-Puffer verdünnt, sodass eine Verdünnung von 1:5000 entstand. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer (0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS) konnte der Sekundärantikörper mit Hilfe des Odyssey Infrared Imager LICOR detektiert werden.

2.5.9 Blutbildanalyse

Zur Erstellung der Blutbilder wurde der Herzmuskel punktiert, das Blut entnommen und in ein mit 1,6 ml EDTA pro ml Blut versetztes Reaktionsgefäß überführt. Die Analyse des EDTA-Blutes erfolgte mittels ADVIA 2120.

Das ADVIA 2120 detektiert die verschiedenen Blutzellen über unterschiedliche Lichtmessmethoden. Dabei durchläuft eine konstante Analysemenge den Messbereich und wird von Schmal-Winkel streuendem Licht (2° - 3°) und Weit-Winkel streuendem Licht (5° - 15°) durchleuchtet. Das Gerät beschreibt somit die einzelnen Blutzellen nach Zell- oder Nukleusgröße, sowie nach der nukleolären Konfiguration (Gestalt und Dichte).

2.5.10 Statistische Auswertung

Für die Auswertung und Darstellung der erhobenen Messwerte wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet. Die Auswertung erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, als Mittelwert \pm S.E.M. (standard error of the mean). Die Signifikanzprüfung wurde mit einem ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant angesehen und mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) bzw. *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

3 Resultate

Am conplastischen Mausstamm B6-mt^{ALR} wurde die Auswirkung der Mutation des OXPHOS *ND2*-Gens auf die ROS-Generierung und Genexpressionsprofile in der Leber im Vergleich zum Kontrollstamm B6-mt^{AKR} untersucht. Dabei wurden insbesondere Gene analysiert, die für die metabolische Regulation, die antioxidative Abwehr sowie Alterungsprozesse eine wichtige Rolle spielen. Zudem wurden die Entwicklung des Körpergewichts und die Blutglukosespiegel im Alterungsverlauf über einen Zeitraum von bis zu 24 Monaten dokumentiert.

Soweit nicht anders beschrieben, erhielten alle Tiere eine Standarddiät. Die Versuchstiere wurden in Kohorten zu 5 bis 7 Tieren nach ihrem Alter (3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monate) für Gewebs- und Genexpressionsanalysen stratifiziert.

Aus Gründen der besseren Verständlichkeit wird der B6-mt^{ALR}-Mausstamm als ALR-Stamm, der Kontrollstamm B6-mt^{AKR} als AKR-Stamm bezeichnet.

3.1 Altersabhängige Entwicklung des Körpergewichts von ALR- und AKR- Mäusen

Das Gewicht der Tiere wurde zu dem angegebenen Lebensalter zwischen 8 und 12 Uhr morgens bestimmt (2.5.3).

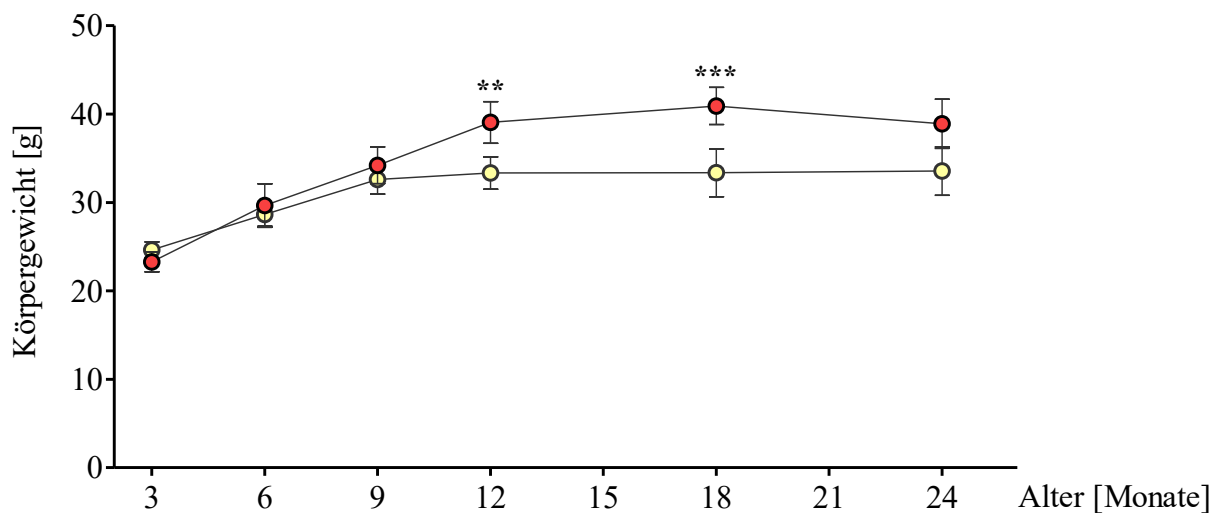


Abb. 3.1: Altersabhängige Entwicklung des Körpergewichts von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. ** $p < 0,01$ ALR 12 Monate vs. AKR 12 Monate; *** $p < 0,001$ ALR 18 Monate vs. AKR 18 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Beide Mausstämme zeigten im ersten Lebensjahr eine vergleichbare lineare Zunahme des Körpergewichts. Ab dem Alter von 12 Monaten lag das Körpergewicht der ALR-Tiere 3 bis 5 g unter dem der AKR-Tiere (Abb. 3.1). Dieser Unterschied war zu den Zeitpunkten 12 und 18

Monate statistisch signifikant, sodass die *ND2*-Mutation einen Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichts unter einer Standarddiät hatte.

3.2 Altersabhängiger Verlauf der Nüchtern-Blutglukosekonzentration

Die Messung der Blutglukosekonzentration erfolgte nach einer 12-stündigen Fastenperiode aus dem Blut des Schwanzes mittels der Glukoseoxidase-Methode (2.5.4).

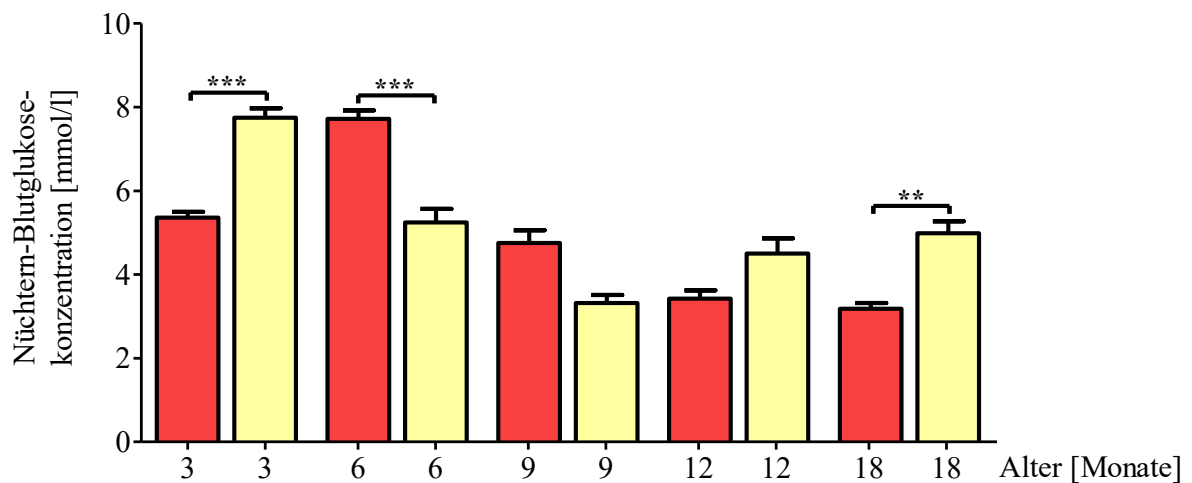


Abb. 3.2: Altersabhängiger Verlauf der Nüchtern-Blutglukosekonzentration von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

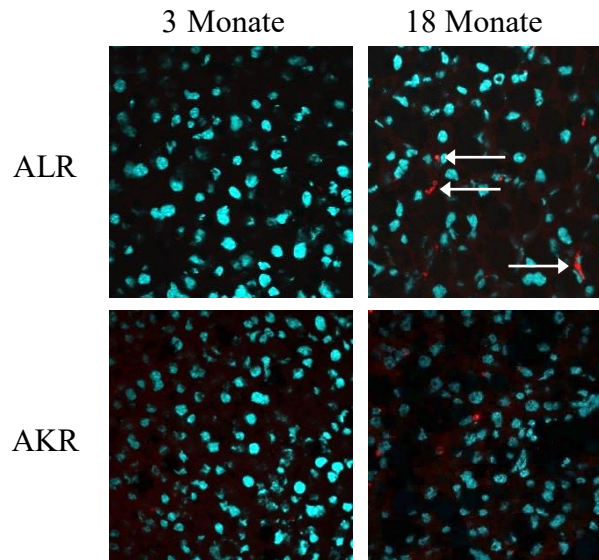
Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. ** $p < 0,01$ ALR 18 Monate vs. AKR 18 Monate; *** $p < 0,001$ ALR 3 Monate vs. AKR 3 Monate, ALR 6 Monate vs. AKR 6 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Tiere des ALR-Stammes wiesen in den ersten 9 Monaten eine Abnahme, anschließend eine Zunahme der Nüchtern-Blutglukosekonzentrationen auf. Im Gegensatz dazu konnte beim AKR-Kontrollstamm eine Zunahme der Nüchtern- Blutglukosekonzentrationen zwischen 3 und 6 Monaten und folgend eine stetige Abnahme verzeichnet werden (Abb. 3.2). Dadurch traten zu den Zeitpunkten 3, 6 und 18 Monate signifikante Unterschiede zwischen beiden Stämmen von jeweils ungefähr 2 mmol/l auf (Abb. 3.2).

3.3 Bestimmung von Superoxiden mittels MitoSOX

Die Bestimmung der Superoxidanionen-Konzentration (O_2^-) erfolgte mittels Färbung eines MitoSOXTM-Red-Mitochondrial-Superoxid-Indikators (2.5.5) in Lebergewebe von AKR- bzw. ALR-Mäusen. Anschließend folgte eine Fluoreszenzmikroskopie und die quantitative Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen (2.5.5).

A



B

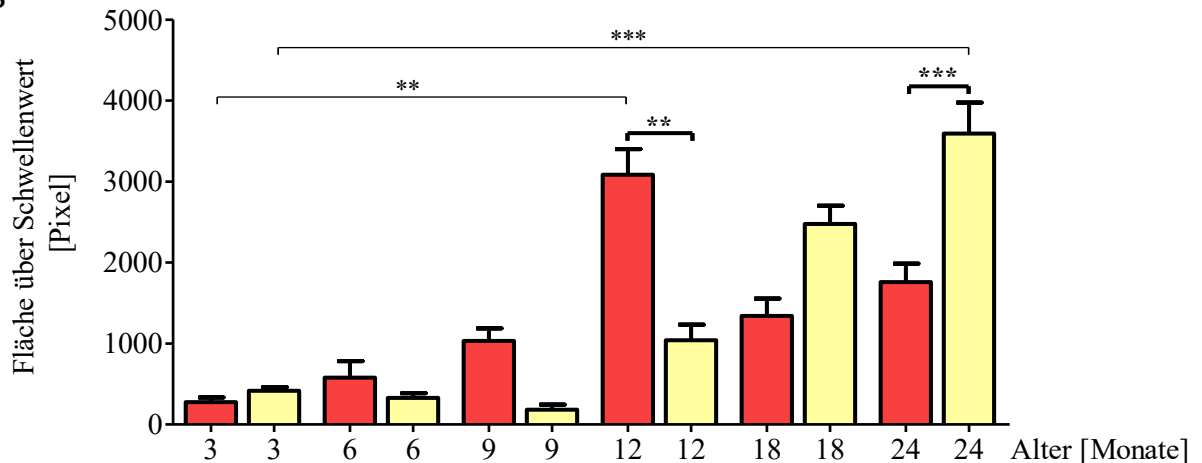


Abb. 3.3: Altersabhängiger Verlauf der hepatischen Superoxidanionen-Konzentration von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Abb. 3.3A: Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Leber der untersuchten Mausstämme. Der blaue Farbstoff (DAPI) visualisiert die Zellkerne der Hepatozyten. Rot fluoreszierend (Pfeil) sind die Superoxidanionen mittels MitoSOX™ Red dargestellt. Abb. 3.3B: Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 25 - 35$ Bildern von 5 - 7 Tieren. $**p < 0,01$ ALR 12 Monate vs. AKR 12 Monate, AKR 3 Monate vs. AKR 12 Monate; $***p < 0,001$ ALR 24 Monate vs. AKR 24 Monate, ALR 3 Monate vs. ALR 24 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Bei ALR-Tieren konnte ein signifikanter Anstieg der Superoxidanionen-Konzentration über 24 Monate nachgewiesen werden. Der Kontrollstamm zeigte dagegen einen signifikanten Anstieg im ersten Lebensjahr. Im zweiten Lebensjahr war die Superoxidanionen-Bildung dieses Stammes verringert (Abb. 3.3B). Dadurch ließen sich im Alter von 12 Monaten beim AKR-Stamm eine 3-fach höhere und im Alter von 24 Monaten beim ALR-Stamm eine 2-fach höhere Superoxidanionen-Konzentration messen (Abb. 3.3B).

3.4 Kopienzahl mitochondrialer DNA (mtDNA)

Die mtDNA-Kopienzahl von Lebergewebe wurde mittels des NovaQUANT Mouse Mitochondrial to Nuclear DNA Ratio Kits® bestimmt (2.5.7.3).

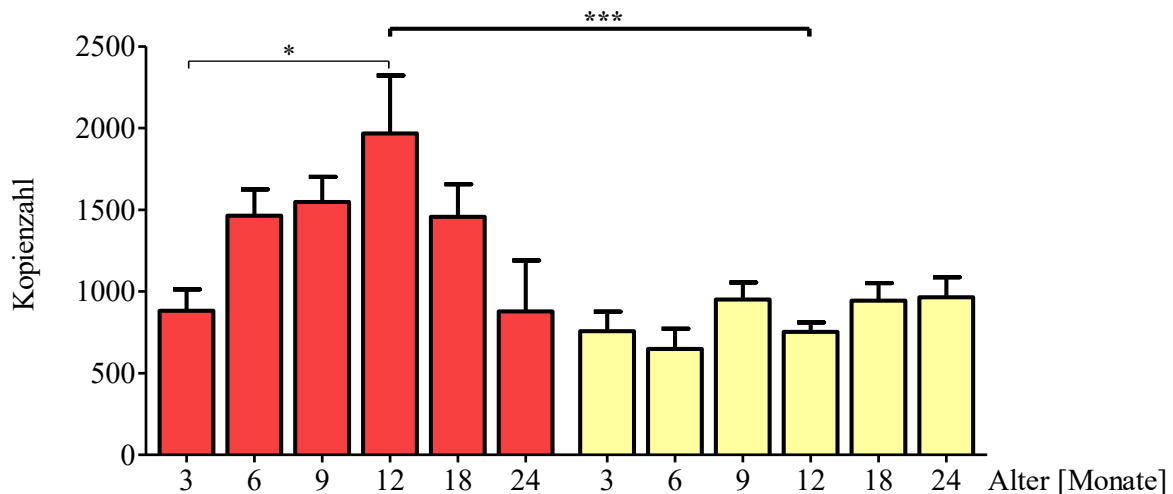


Abb. 3.4: Altersabhängige Entwicklung der Kopienzahl der mitochondrialen DNA (mtDNA) in Relation zur nukleären DNA von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. * $p < 0,05$ AKR 3 Monate vs. AKR 12 Monate; *** $p < 0,001$ ALR 12 Monate vs. AKR 12 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Tiere des ALR-Stammes wiesen über den gesamten Untersuchungsraum eine relativ konstante mtDNA-Kopienzahl auf. Die mtDNA-Kopienzahl nahm beim AKR-Stamm zwischen 3 und 12 Monaten signifikant zu und anschließend wiederum auf das Niveau des ALR-Stammes ab (Abb. 3.4). Somit bestand im Alter von 12 Monaten zwischen beiden Stämmen ein signifikanter Unterschied, wobei in AKR-Tieren die mtDNA-Kopien doppelt so hoch wie bei ALR-Tieren ausfielen (Abb. 3.4).

Die Daten belegen, dass Mitochondrien mit einer *ND2*-Mutation eine verminderte mtDNA-Kopienzahl besitzen.

3.5 Altersabhängige Expression mitochondrialer Gene in Lebergewebe

Im Folgenden sind die altersabhängigen mRNA-Expressionsdaten metabolisch relevanter und antioxidativer Gene im Lebergewebe dargestellt. Ermittelt wurden die Daten nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR (2.5.6). Als Bezugswert diente der Mittelwert der Genexpressionswerte aus den Messdaten des AKR-Stammes im Alter von 3 Monaten.

3.5.1 Die ND2-Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I

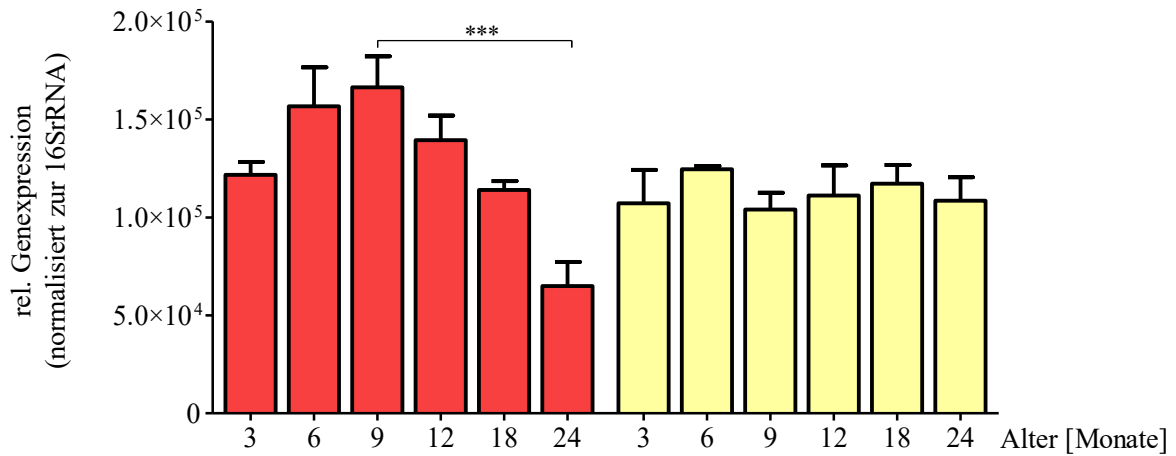


Abb. 3.5: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der *ND2* von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen
 Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. *** $p < 0,001$ AKR 9 Monate vs. AKR 24 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Die Expression des *ND2*-Gens blieb beim ALR-Stamm über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant, während es beim Kontrollstamm bis zum Alter von 9 Monaten zu einer Zunahme und anschließend zu einer signifikanten Abnahme der *ND2*-Genexpression um ca. 60 % kam (Abb. 3.5).

3.5.2 Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A (TFAM)

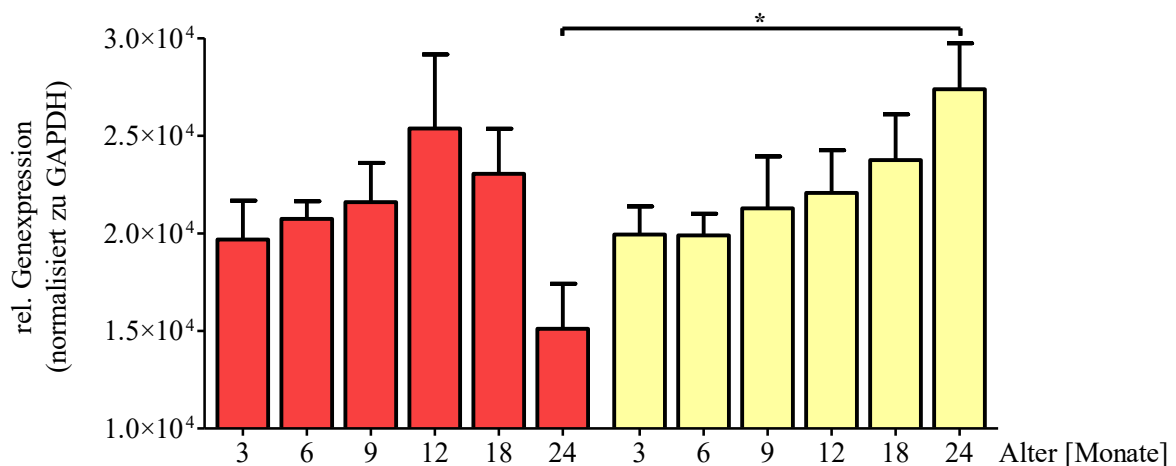


Abb. 3.6: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression von *TFAM* von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen
 Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. * $p < 0,05$ ALR 24 Monate vs. AKR 24 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Der ALR-Stamm zeigte eine altersabhängige Zunahme der *TFAM*-Genexpression zwischen 3 und 24 Monaten um ca. 40 %. Der AKR-Kontrollstamm wies hingegen zuerst eine Zunahme der *TFAM*-Genexpression bis zum 12. Lebensmonat auf. Danach nahm die Genexpression bis

zum 24. Lebensmonat ab (Abb. 3.6). Dieser Verlauf korrelierte mit der mtDNA-Kopienzahl beim AKR-Stamm (Abb. 3.4). Im ALR-Mausstamm hingegen korrelierten die *TFAM*-Genexpressionswerte zwischen dem 9. und 24. Lebensmonat nicht mit der mtDNA Kopienzahl (Abb. 3.4).

3.5.3 Superoxiddismutase Typ 1 (SOD1)

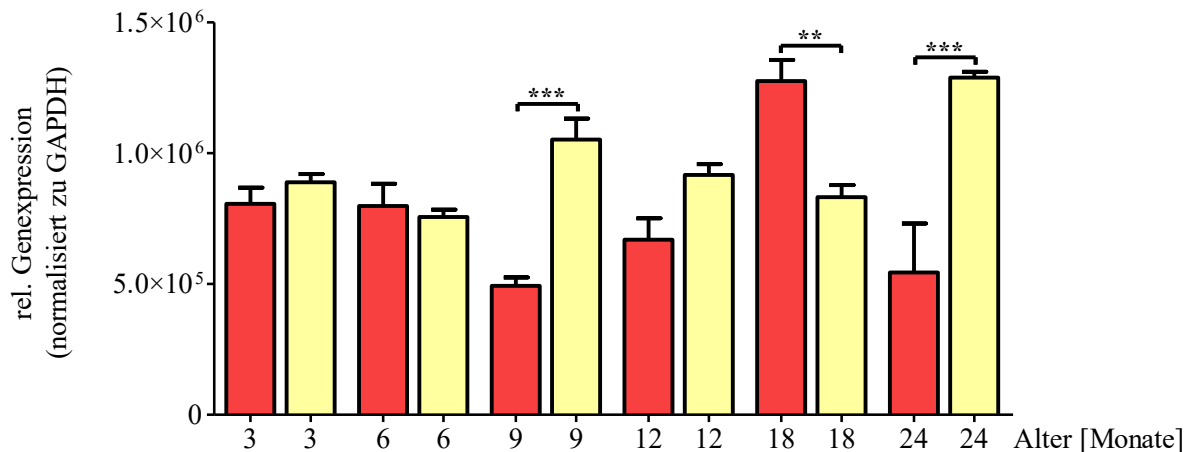


Abb. 3.7: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der *SOD1* von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. ** $p < 0,01$ ALR 18 Monate vs. AKR 18 Monate; *** $p < 0,001$ ALR 9 Monate vs. AKR 9 Monate, ALR 24 Monate vs. AKR 24 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Beide Mausstämme zeigten in den ersten 6 Lebensmonaten vergleichbare *SOD1*-Genexpressionen. Danach kam es beim ALR-Stamm im Alter von 9 Monaten zu einer Zunahme der Genexpression um ca. 40 %. Auch im Alter von 24 Monaten fiel diese sehr hoch aus (Abb. 3.7). Der AKR-Stamm zeigte zwischen 9 und 18 Monaten eine Zunahme der *SOD1*-Genexpression um den Faktor 2 (Abb. 3.7). Während im Alter von 9 Monaten der ALR-Stamm eine 10-fach höhere *SOD1*-Expression zeigte, fiel der Unterschied im 18. Lebensmonat zugunsten des AKR-Stammes aus. Im Alter von 24 Monaten war die *SOD1*-Genexpression des ALR-Stammes 2,5-fach im Vergleich zum AKR-Stamm erhöht (Abb. 3.7).

In Bezug zur Superoxidanionen-Konzentration ließ sich bei beiden Stämmen keine positive Korrelation im Altersverlauf darstellen. Im Gegenteil reagierten beide Stämme bei steigenden Superoxidanionen-Konzentrationen mit einer Abnahme der *SOD1*-Genexpression (Abb. 3.3B).

3.5.4 Superoxiddismutase Typ 2 (SOD2)

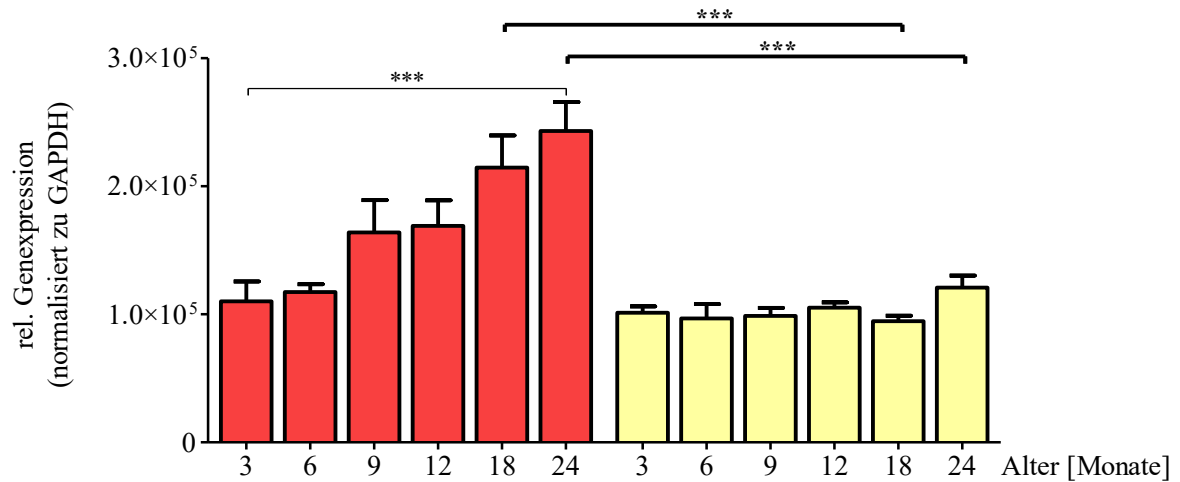


Abb. 3.8: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der *SOD2* von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. *** $p < 0,001$ ALR 18 Monate vs. AKR 18 Monate, ALR 24 Monate vs. AKR 24 Monate, AKR 3 Monate vs. AKR 24 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Der ALR-Mausstamm wies über den gesamten Untersuchungszeitraum eine konstante *SOD2*-Genexpression auf. Demgegenüber nahm die Genexpression beim AKR-Stamm kontinuierlich und signifikant zu (Abb. 3.8). Dadurch bestanden zu den Zeitpunkten 18 und 24 Monate signifikante Unterschiede zwischen beiden Stämmen, im Sinne einer ca. 2-fach geringeren *SOD2*-Genexpression des ALR-Stammes (Abb. 3.8).

Eine Korrelation zum Verlauf der Superoxidanionen-Konzentration konnte bei keinem Stamm nachgewiesen werden (Abb. 3.3B).

3.5.5 Katalase

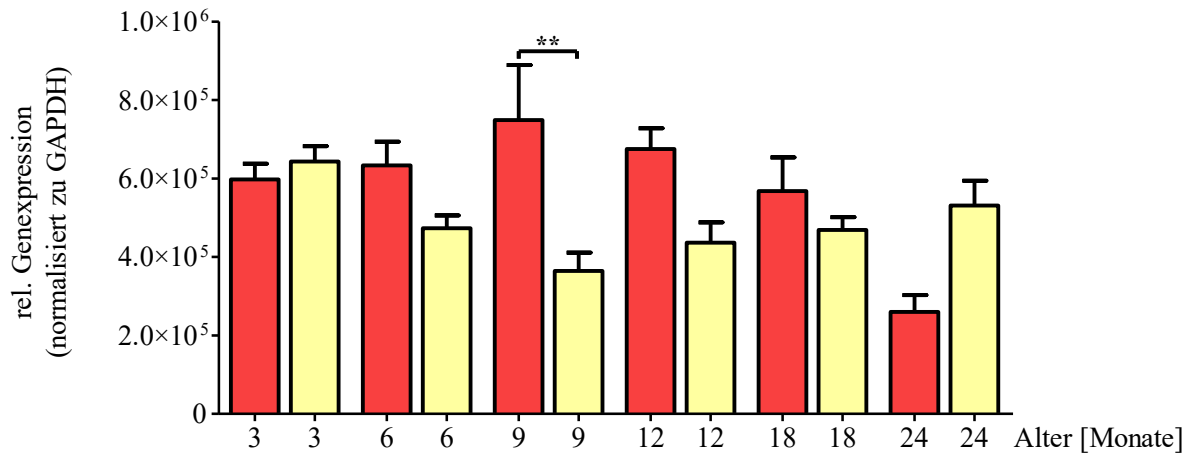


Abb. 3.9: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der *Katalase* von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. $**p < 0,01$ ALR 9 Monate vs. AKR 9 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Der ALR-Stamm zeigte bezüglich der *Katalase*-Genexpression einen gegensätzlichen Altersverlauf zum AKR-Stamm (Abb. 3.9). Dementsprechend wurde beim ALR-Stamm im Alter von 9 Monaten eine 2-fach geringere Genexpression nachgewiesen. Ab einem Peak im 9. Lebensmonat nahm die *Katalase*-Genexpression im AKR-Stamm bis zum Alter von 24 Monaten ab. Im Alter von 24 Monaten war daher die Genexpression des ALR-Stammes höher als beim AKR-Stamm (Abb. 3.9).

Zu den Zeitpunkten 9 und 24 Monate verhielten sich beide Stämme konsistent zur Superoxidanionen-Konzentrationen dieser Zeitpunkte (Abb. 3.3B). Ein Triggereffekt der Superoxidanionen-Konzentration auf die Genexpression der *Katalase* erscheint somit möglich.

3.5.6 Uncoupling Protein 2 (UCP2)

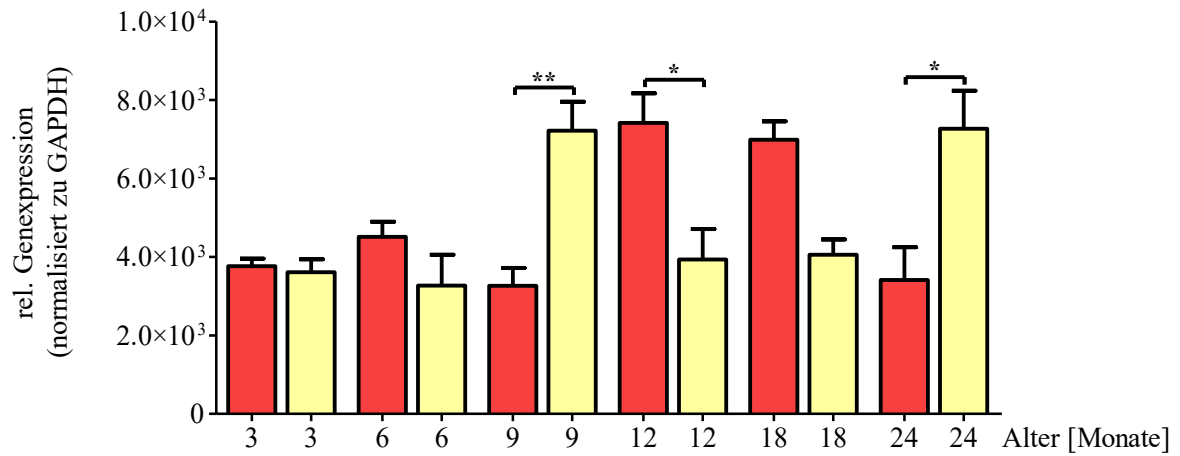


Abb. 3.10: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression des *UCP2* von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. * $p < 0,05$ ALR 12 Monate vs. AKR 12 Monate, ALR 24 Monate vs. AKR 24 Monate; ** $p < 0,01$ ALR 9 Monate vs. AKR 9 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Die *UCP2*-Genexpression der beiden Stämme unterschied sich vor allem im Alter von 9 bis 24 Monaten (Abb. 3.10). Der ALR-Stamm wies zu den Zeitpunkten 9 und 24 Monate eine 2-fach höhere *UCP2*-Genexpression auf. Der AKR-Stamm zeigte hingegen im Alter von 12 und 18 Monaten eine jeweils etwa 2-fach höhere Genexpression als der ALR-Stamm (Abb. 3.10). Diese Verläufe zeigen eine Analogie zum Expressionsverlauf der Katalase und SOD1 (Abb. 3.7, Abb. 3.9).

Bezüglich der Superoxidanionen-Konzentration ist die *UCP2*-Genexpression bei beiden Stämmen nicht konsistent (Abb. 3.3B).

3.5.7 Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)

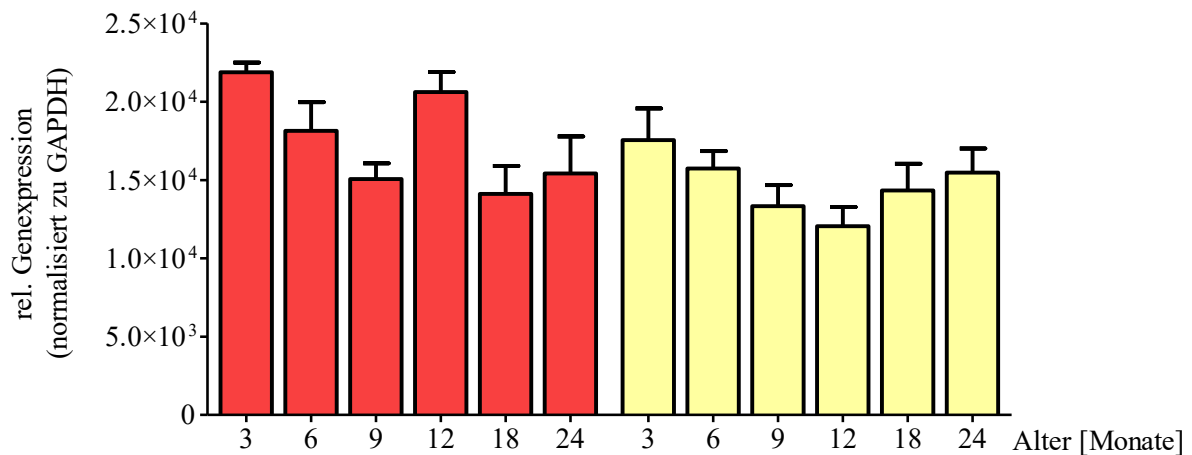


Abb. 3.11: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression von *mTOR* von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren.

Bei beiden Mausstämmen lag zum Zeitpunkt 3 Monate die höchste Genexpression von *mTOR* vor. Danach kam es bei beiden Stämmen zu einem Abfall und anschließender Zunahme der Genexpression. Ausnahme hierbei ist die Genexpression im Alter von 12 Monaten beim AKR-Stamm (Abb. 3.11). Zwischen den Stämmen bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der *mTOR*-Genexpression, sodass die *ND2*-Mutation wahrscheinlich keinen Effekt auf dieses metabolische Sensorgen bei gleichem Nahrungsangebot zu haben scheint.

3.6 Altersabhängige Proteinexpression von Alterungsmarkern und Atmungskettenkomplexen in Lebergewebe

Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte mittels Western-blot-Analysen (2.5.8). Die Expression des Zielproteins wurde gegen das Housekeepingprotein β -Actin normalisiert. Um eine Vergleichbarkeit der untersuchten Proteinexpressionen im Altersverlauf zu erreichen, wurde eine Referenzprobe in allen Western blot Analysen mitgeführt (AKR-Lebergewebe, Alter 1 Monat). Die relativen Proteinexpressionen wurden zu der internen Kontrolle (100 %) normalisiert und somit die Vergleichbarkeit der Expression der Zielproteine im Altersverlauf erreicht.

3.6.1 Histon H2A.X

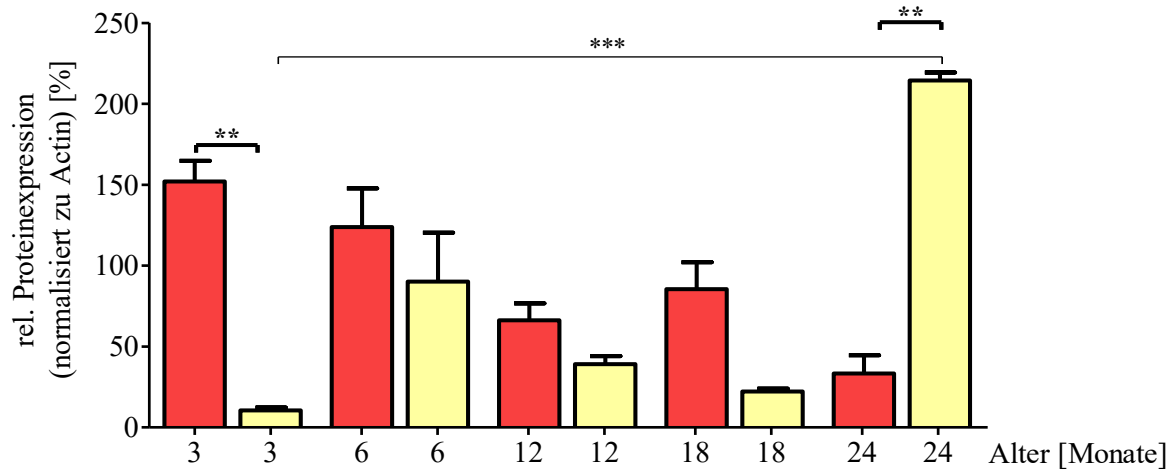


Abb. 3.12: Altersabhängiger Verlauf der Proteinexpression des Histons H2A.X von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. $**p < 0,01$ ALR 3 Monate vs. AKR 3 Monate; $***p < 0,001$ ALR 24 Monate vs. AKR 24 Monate, ALR 3 Monate vs. ALR 24 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Der ALR-Mausstamm zeigte zu Beginn des Untersuchungszeitraumes eine signifikant geringere Proteinexpression des Histons H2A.X als der Kontrollstamm (Abb. 3.12). Nach Zunahme mit einem Peak im Alter von 6 Monaten war im Alter von 24 Monaten ein extrem starker Anstieg der Histon H2A.X-Proteinexpression nachweisbar. Diese war 20-fach höher als im Alter von 3 Monaten und auch signifikant höher als beim AKR-Stamm, der im Alterungsverlauf eine kontinuierliche Abnahme der Histon H2A.X-Proteinexpression aufwies (Abb. 3.12).

3.6.2 p53

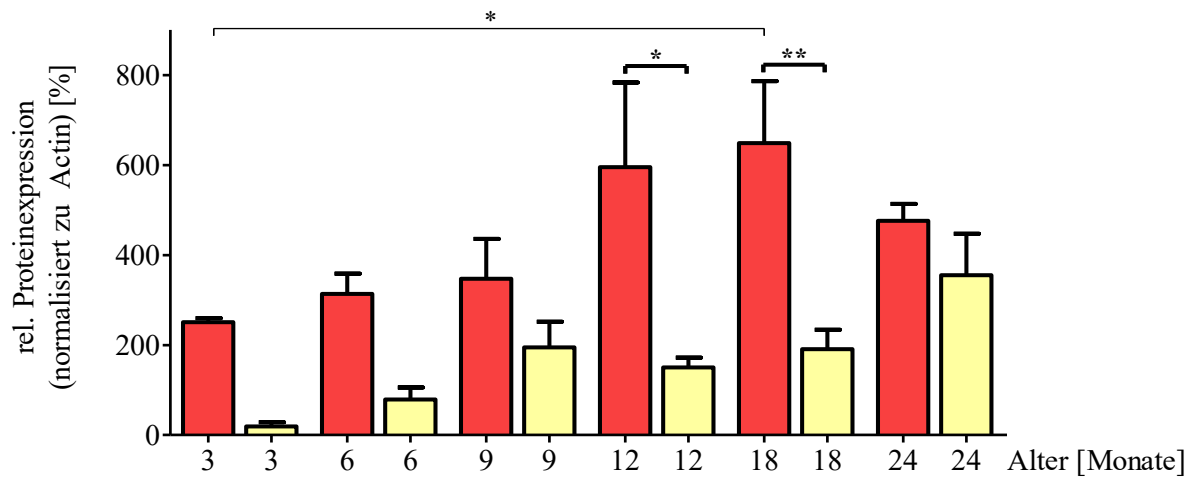


Abb. 3.13: Altersabhängiger Verlauf der Proteinexpression von p53 von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. * $p < 0,05$ ALR 12 Monate vs. AKR 12 Monate, AKR 3 Monate vs. AKR 18 Monate; ** $p < 0,01$ ALR 18 Monate vs. AKR 18 Monate (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Beide Stämme wiesen über den Untersuchungsverlauf steigende p53-Proteinexpressionen auf, (Abb. 3.13). ALR-Tiere zeigten zu jedem Alterszeitpunkt eine geringere p53-Proteinexpression als die AKR-Kontrolltiere, die im Alter von 12 (4-fach geringer) und 18 Monaten (3,5-fach geringer) signifikant war (Abb. 3.13).

3.6.3 Atmungskettenkomplexe

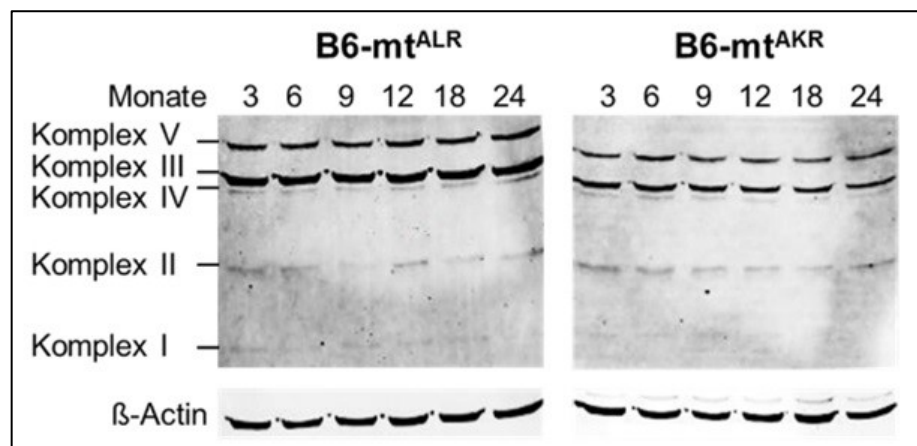


Abb. 3.14: Western-blot-Analysen der Atmungskettenkomplexe I bis V im altersabhängigen Verlauf

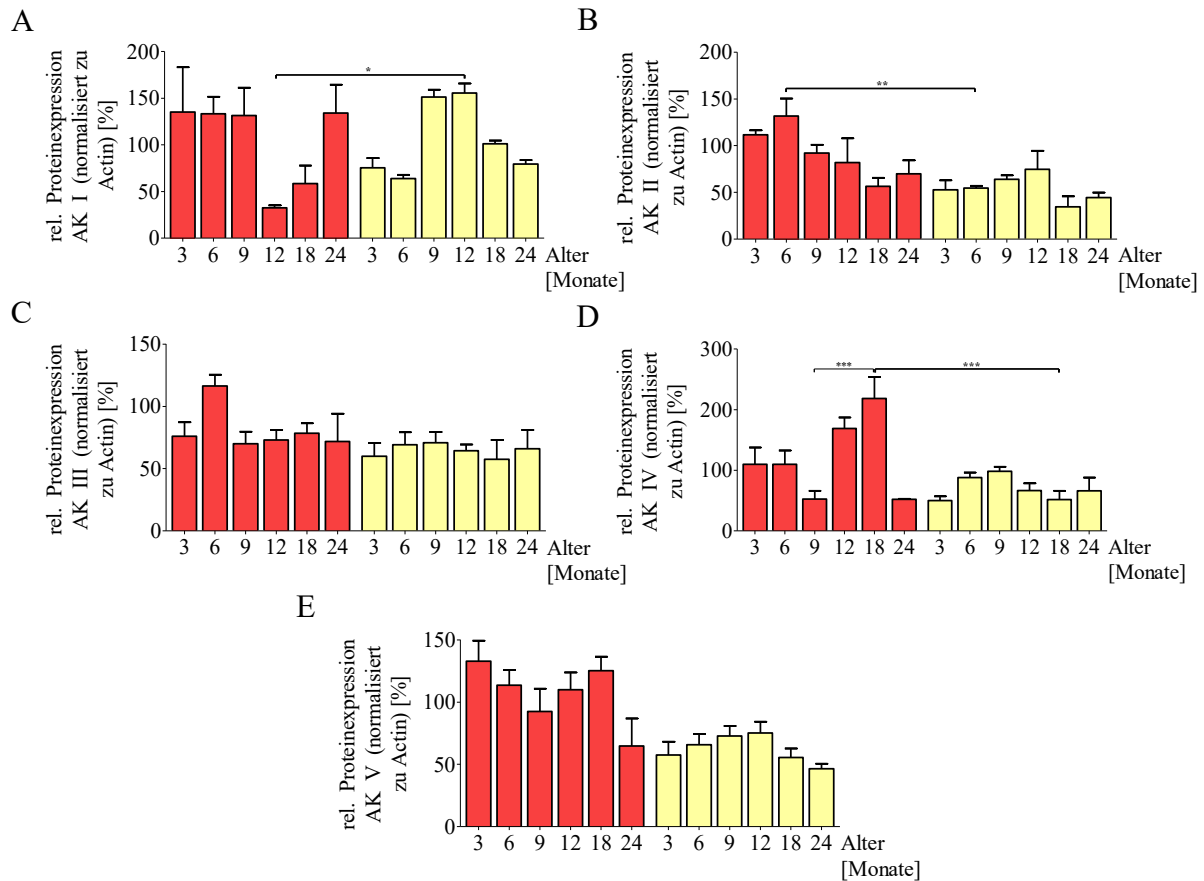


Abb. 3.15: Altersabhängiger Verlauf der Proteinexpression von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (AK) von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. A Atmungskettenkomplex I, B Atmungskettenkomplex II, C Atmungskettenkomplex III, D Atmungskettenkomplex IV, E Atmungskettenkomplex V. * $p < 0,05$ ALR 12 Monate vs. AKR 12 Monate (A); ** $p < 0,01$ ALR 6 Monate vs. AKR 6 Monate (B); *** $p < 0,001$ ALR 18 Monate vs. AKR 18 Monate (C), AKR 9 Monate vs. AKR 18 Monate (C) (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Insgesamt zeigte sich mit Ausnahme von Komplex I bei allen anderen Atmungskettenkomplexproteinen eine niedrigere Proteinexpression beim ALR-Stamm im Vergleich zum AKR-Stamm (Abb. 3.15). Bei den Atmungskettenkomplexen II und IV wird dies durch die signifikant geringere Proteinexpression des ALR-Stammes im Alter von 6 bzw. 18 Monaten besonders deutlich (Abb. 3.15B und 3.15D).

3.7 Blutanalyse

Für die einzelnen Tiere wurde, wie unter 2.5.9 beschrieben, ein Differenzialblutbild erstellt. Die Entnahme des Blutes erfolgte jeweils nach 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten.

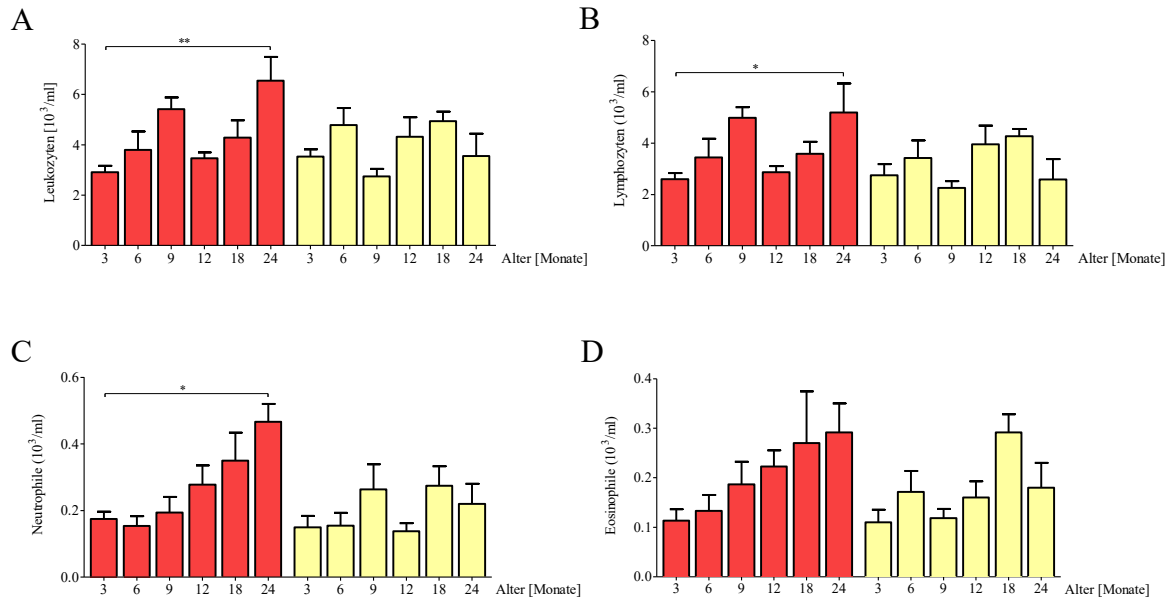


Abb. 3.16: Altersabhängige Entwicklung der Blutbilder von AKR- (rot) und ALR- (gelb) Mäusen

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von jeweils $n = 5 - 7$ Tieren. * $p < 0,05$ AKR 3 Monate vs. AKR 24 Monate (B,C), * $p < 0,01$ AKR 3 Monate vs. AKR 24 Monate (A) (ANOVA mit Bonferroni Korrektur)

Beide Mausstämme zeigten Leukozytenzahlen, die sich im Referenzbereich für diese Spezies befinden. Auffällig war hierbei ein oszillatorisches Muster mit Peaks im Alter von 9 und 24 Monaten beim AKR-Stamm sowie 6 und 18 Monaten beim ALR-Stamm (Abb. 3.16A). Das oszillatorische Muster war durch den Lymphozytenanteil bedingt (Abb. 3.16B). Die neutrophilen Granulozytenzahlen hingegen waren beim AKR-Stamm durch einen kontinuierlichen Anstieg zwischen dem 9. und 24. Monat gekennzeichnet (Abb. 3.16C, D). Beim ALR-Stamm war ein Anstieg der neutrophilen Granulozytenzahlen im fortgeschrittenen Lebensalter nicht nachweisbar (Abb. 3.16C, D). Die eosinophilen Granulozytenzahlen zeigten im AKR-Stamm ebenfalls einen ansteigenden Verlauf im Gegensatz zu einem oszillatorischen Muster beim ALR-Stamm (Abb. 3.16D). Somit hat die *ND2*-Mutation Effekte auf das angeborene zelluläre Immunsystem im Blut.

4 Diskussion

Der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf das Altern und die Entstehung altersassoziierter Erkrankungen ist seit Jahren Bestandteil intensiver Forschungen. Die Autoren sind sich dabei einig, dass starker oxidativer Stress den Alterungsprozess über verschiedenste Signalkaskaden begünstigt. Nichtsdestotrotz ist die ROS-Bildung nicht zwingend mit der Zellalterung und Krankheiten assoziiert [57]. Vielmehr spielen unter anderem die Dauer des oxidativen Stresses, die ROS-Konzentrationen sowie die Aktivität der antioxidativen Enzyme und mitohormetische Adaptationen eine entscheidende Rolle [11].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich eine mitochondriale DNA-Mutation in einer Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I auf die ROS-Generierung, die Expression der OXPHOS-Komplexe und mitohormetische Adaptationen im Alterungsverlauf verhalten. Als Modellorgan für diese Untersuchungen wurde die Leber gewählt, da Hepatozyten sich durch ein hohes Maß an mitochondrialer Dynamik auszeichnen. Zudem ist die Leber über humorale Mediatoren wie dem Fetuin A mit inflammatorischen Signalen im viszeralen Fettgewebe verbunden, ein Prozess, der wesentlich zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus beiträgt [138]. Im Versuchsdesign wurde der conplastische Mausstamm (ALR) verwendet, welcher einen Polymorphismus auf dem mitochondrialen Genom in einem nukleären B6-Hintergrund besitzt (1.6). *mtND2* kodiert eine Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I (1.6), die für die Protonentranslokation verantwortlich ist [49,139]. Dabei zielte die Arbeit darauf ab, den Stoffwechsel sowie die oxidative Abwehr des conplastischen ALR-Mausstammes unter einer Standarddiät mit normaler Energiedichte im Verlauf der Alterung näher zu beleuchten. Auf den Einsatz von Hochfettdiäten oder anderen metabolischen Stressoren wurde verzichtet, um Basisdaten zu den physiologischen Effekten der Mutation zu erhalten.

4.1 Auswirkungen des *ND2*-Genpolymorphismus auf das Körpergewicht und die Blutglukosekonzentration im Verlauf der Alterung

Zunächst wurden bei dem ALR- als auch AKR-Mausstamm physiologische Parameter wie Gewicht und Nüchtern-Blutglukosekonzentration über einen Zeitraum von 18 Monaten gemessen. Hierbei zeigten ALR-Tiere ab dem Zeitpunkt 12 Monate ein signifikant niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu AKR-Tieren. Außerdem war auffällig, dass die ALR-Tiere ihr Gewicht ab einem Alter von 12 Monaten konstant hielten (Abb. 3.1). In anderen Arbeiten wurde

bei conplastischen Mäusen mit B6-Hintergrund meist eine kontinuierliche Gewichtszunahme festgestellt [30,128].

Im Alter kommt es infolge verschiedenster Veränderungen des Stoffwechsels zu einem Verlust der Muskelmasse, die mit einem geringeren Grundumsatz einhergeht [2,12]. Bei gleichbleibenden Ernährungsgewohnheiten kann dies zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme führen [58]. Da sowohl ALR- als auch AKR-Tiere freien Zugang zum Futter hatten (2.5.2), ist anzunehmen, dass sie ihre Nährstoffzufuhr im Alter nicht reduzierten. Warum ALR-Tiere im Alter jedoch nicht weiter an Gewicht zunahmen, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht genau geklärt werden. Möglicherweise führt die *ND2*-Mutation nicht zu einer solch starken altersbedingten Stoffwechselreduktion, wodurch der Grundbedarf dieser Tiere gegenüber AKR-Tieren höher ist.

Die Bestimmung der Nüchtern-Blutglukosekonzentrationen ergab abnehmende Werte beim Kontrollstamm und im Gegensatz dazu beim ALR-Stamm im juvenilen Lebensalter ab-, im späteren Lebensalter wieder zunehmende Konzentrationen (Abb. 3.2). Dabei lagen die Nüchtern-Blutglukosekonzentrationen beider Stämme über den gesamten Alterungsprozess im normoglykämischen Bereich. Die Entwicklung eines Diabetes mellitus wurde bisher jedoch fast ausschließlich durch Fütterung einer Hochfettdiät erreicht (<https://www.jax.org/strain/000664>).

4.2 Einfluss der *mtND2*-Genmutation auf die mitochondriale Dynamik im Verlauf der Alterung

Um den mitochondrialen Stoffwechsel zu charakterisieren wurden die Genexpression von *mtND2* und *TFAM*, sowie die mtDNA-Kopienzahl und die Proteinexpressionen der Atmungskettenkomplexe bestimmt.

Es wurde zwar eine konstante Genexpression des Gens *mtND2* über den gesamten Untersuchungszeitraum in der ALR-Mutante ermittelt (Abb. 3.5), jedoch zeigte sich eine vermehrte Proteinexpression der ND2-Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I im Alter von 9 und 12 Monaten (Abb. 3.15A). Die gesteigerte Proteinexpression korrelierte zudem mit sinkenden Superoxid-Konzentrationen (Abb. 3.3B). Die inverse Korrelation zwischen Superoxidanionen-Konzentration (Abb. 3.3B) und ND2-Proteinexpression (Abb. 3.15A) war im Alter zwischen 3 und 18 Monaten auch beim AKR-Mausstamm darstellbar. Diese Daten sind different zu Studien, die eine erhöhte Atmungskettenaktivität mit vermehrter ROS-Bildung in Verbindung brachten [49,63,140–142]. Es muss hier jedoch kritisch angemerkt werden, dass

ein großer Teil dieser Studien mit sehr jungen Tieren durchgeführt wurde, so dass Änderungen im Alterungsverlauf nach 12 Monaten nicht gut dokumentiert sind.

Die Ergebnisse lassen jedoch auf einen gleichmäßigen Protonentransport über die innere Mitochondrienmembran und eine effizient funktionierende Atmungskette im ALR-Mausstamm schließen. Schauer et al. (2015) konnten bereits nachweisen, dass die *mtND2*-Mutation in Fibroblasten zu einer gesteigerten Aktivität des Atmungskettenkomplexes I führt [100]. Der damit gesteigerte Elektronentransport bestätigt somit eine erhöhte Energieverfügbarkeit in Form von ATP im ALR-Stamm [100]. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die enzymatischen Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe nicht identisch mit der Proteinexpression sind, die Reserven bei erhöhtem Energiebedarf der Zelle aufweist.

Des Weiteren wurde eine konstante mtDNA-Kopienzahl in der Mutante festgestellt (Abb. 3.4). Die Anpassung der Kopienzahl erfolgt dabei entweder als Gegenregulation zu einer gesteigerten Schädigung der mtDNA oder einer Zunahme der Mitomasse bei erhöhtem Energiebedarf [143]. Der AKR-Kontrollstamm wies einen Anstieg der mtDNA-Kopienzahl bis zu einem Alter von 12 Monaten auf. Diese nahm mit fortschreitendem Lebensalter wieder ab (Abb. 3.4). Dies deutet darauf hin, dass der mutierte Organismus ALR weniger anfällig für altersbedingte Mutationen auf dem mitochondrialen Genom ist. Dass ALR-Tiere tatsächlich durch weniger mtDNA-Mutationen gekennzeichnet sind, belegt die konstant erhöhte Genexpression von TFAM dieses Mausstammes während der Alterung. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrolle insbesondere bis zum Zeitpunkt 6 Monate und erneut ab dem Alter von 18 Monaten eine verminderte TFAM-Genexpression (Abb. 3.6). TFAM wird neben der Funktion als Transkriptionsfaktor auch eine Rolle bei der Reparatur der mtDNA zugeschrieben [40,144]. Sowohl im ALR- als auch im AKR-Mausstamm korrelierte die mtDNA-Kopienzahl mit der TFAM-Genexpression (Abb. 3.4, Abb. 3.6).

An dieser Stelle lassen sich jedoch nur rein quantitative Aussagen zur mtDNA treffen. Um Aussagen über das Ausmaß der mtDNA-Schädigung durch Mutationen während der Alterung in Mutante und Kontrolle treffen zu können, wäre die Durchführung einer PCR nach Rothfuss et al. (2010) [145] ein geeigneter Ansatz.

Verglichen mit dem AKR-Mausstamm zeigte der ALR-Mausstamm einen konstanten und effizienten mitochondrialen Stoffwechsel im Verlauf der Alterung. Aufgrund der erhöhten ND2-Proteinexpression (Atmungskettenkomplex I, Abb. 3.15), der gleichbleibend erhöhten Genexpression von TFAM (Abb. 3.6) sowie der konstanten mtDNA-Kopienzahl (Abb. 3.4) in ALR-Mäusen lässt sich spekulieren, dass Prozesse wie die Mitophagie (Autophagie der Mitochondrien) weniger von Bedeutung sind. Die Mitophagie dient der Entfernung von

schadhaften Mitochondrien aus der Zelle. Während der Alterung nimmt die Mitophagie ab, wodurch Mutationen des mitochondrialen Genoms akkumulieren können [146,147].

4.3 Auswirkungen der mtND2-Mutation auf die alterungsabhängige Akkumulation von Superoxidanionen

In Bezug auf die Zellalterung ist die quantitative Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies ein wichtiger Parameter, da oxidative Schädigungen der mtDNA den Alterungsprozess begünstigen und mitohormetische Signalwege diesem Prozess entgegenwirken (1.1).

Die Ermittlung der ROS-Konzentration in einer Zelle ist eine technische Herausforderung, da reaktive Sauerstoffspezies sehr kurzlebige Metabolite sind. Es existiert bis jetzt noch keine Methode, mit der alle ROS-Spezies in zellulären Kompartimenten nachgewiesen werden können. Der Farbstoff Amplex-Red besitzt eine hohe Spezifität für Wasserstoffperoxid im Zytosol. H_2O_2 ist jedoch ein Intermediat im Abbau von Superoxidanionen (O_2^-) und daher abhängig von Peroxidaseaktivitäten. So kann die O_2^- -Konzentration noch wesentlich höher ausfallen. Zudem wird das mitochondrial gebildete O_2^- nicht korrekt erfasst [132]. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die MitoSOXTM Red-Methode angewandt (2.5.5), um den Einfluss der mtND2-Mutation auf die mitochondriale ROS-Akkumulation unter in vivo Bedingungen zu untersuchen. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung mitochondrial gebildeter Superoxidanionen und besitzt eine hohe Stabilität des Indikators [148]. Niemann et al. (2017) konnten durch Zugabe von Antimycin A zeigen, dass der Fluoreszenzfarbstoff MitoSOXTM Red spezifisch O_2^- detektiert [148].

Das Lebergewebe von ALR-Tieren wies zunächst im Alter von 3 Monaten eine erhöhte Bildung mitochondrialer Superoxidanionen auf. Während in den AKR-Kontrolltieren die Superoxidanionen-Konzentration mit dem Alter stetig zunahm, zeigte sich für die ALR-Mutante eine Abnahme der O_2^- -Akkumulation und signifikant erhöhte Konzentrationen erst ab einem Alter von 18 Monaten (Abb. 3.3B). Dieser Unterschied in ALR-Tieren ist am ehesten durch die geringe Expression der OXPHOS-Komplexe in Mitochondrien erklärbar, da die ROS-Level im Vergleich zum späteren Lebensalter zum einen sehr gering ausfielen, zum anderen keinen Anstieg mitohormetischer Genexpressionen zur Folge hatte.

Für den ALR-Mausstamm wurde in Publikationen eine verminderte ROS-Bildung beschrieben, die mit einer Zunahme des Lebensalters assoziiert wurde [139,149]. Dabei wurden die Tiere nur über einen kürzeren Zeitraum untersucht und ausschließlich H_2O_2 ermittelt, sodass sich keine Aussage über den Verlauf der Superoxidanionen-Konzentration treffen lässt.

Hekimi et al. (2011) konnten zeigen, dass sich eine leicht vermehrte ROS-Bildung in der juvenilen Phase positiv auf den Zellstoffwechsel auswirkt. Durch Oxidation von Makromolekülen wird durch gegenregulatorische antioxidative Prozesse der Alterungsprozess verlangsamt [11,93,97,99,150,151]. ROS-Konzentrationen unter diesem hormetischen Schwellenwert wären dementsprechend nicht ausreichend, um protektive Effekte auf die Zelle auszuüben [97,98,152]. Dieser Mechanismus wird als „positiver oxidativer Stress“ im Sinne einer Mitohormesis (1.3.4) bezeichnet und könnte erklären, warum die gering höhere Superoxidanionen-Bildung der ALR-Tiere im Alter von 3 Monaten antioxidative Abwehrmechanismen verstärkt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass ein „ROS burst“ im Alter von 3 Monaten bei Mäusen das Zellwachstum positiv beeinflusst [80]. Mitohormetische Signalwege sind daher nur während dieser Wachstumsperioden effizient ausgebildet.

Im fortgeschrittenen Alter von 18 Monaten haben die beobachteten Superoxidanionen-Anstiege sowohl im Sinne von Harmans freier Radikaltheorie [3] als auch der Mitohormesis (1.3.4) eher schädigende Einflüsse auf die Hepatozyten der ALR-Tiere. Infolge der irreversiblen Schädigung von Makromolekülen durch ROS würde ein schnellerer Alterungsprozess und die Entstehung von Krankheiten resultieren [10,98,152]. Zudem existieren Publikationen, die verschiedene mitochondriale Mutationen in Hinblick auf ihr Mitwirken beim Alterungsprozess untersucht haben. Meist gingen diese mtDNA-Mutationen mit erhöhter Superoxidanionen- bzw. ROS-Bildung einher und beschleunigten den Alterungsprozess [128,148].

Hinsichtlich des hier untersuchten mtND2-Polymorphismus ist es wahrscheinlich, dass die mitohormetische Adaptation im frühen Lebensalter die deutlich erhöhten O_2^- -Konzentrationen im Alter von 18 Monaten in ALR-Mäusen kompensieren. Erst mit Dekompensation der mitohormetischen Prozesse wird der Alterungsprozess beschleunigt.

Die Mutation im mtND2-Gen ist somit ein mitohormetischer Trigger in den ersten 6 Lebensmonaten, der zu einer besseren Adaptation des Organismus gegenüber oxidativen Stress und zur Verlangsamung des Alterungsprozesses führt.

4.4 Auswirkungen der mtND2-Mutation auf die alterungsabhängige Genexpression von antioxidativen Proteinen

Die Proteine der oxidativen Verteidigung dienen dem Abbau von ROS (1.3.2) und können sowohl deren Signalfunktion als auch deren schädliche Wirkungen regulieren (1.3.3) [59].

Die *SOD1*-Genexpression zeigte bei beiden untersuchten Mausstämmen eine leicht oszillierende Expression über den Alterungsverlauf (Abb.3.7). Dabei korrelierten die mRNA-Level der *SOD1* nicht mit den ermittelten Superoxidanionen-Konzentrationen (Abb. 3.3B). Die

Superoxiddismutase 1 ist neben dem Zytosol nur im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Dort dismutiert die SOD1 Superoxidanionen, die vor allem vom Komplex III der Atmungskette gebildet werden. Es werden daher bevorzugt Superoxidanionen im Zytosol durch die SOD1 inaktiviert [62,78], die durch den MitoSOX-Assay nicht erfasst werden konnten. Die oszillierenden Genexpressionsmuster der *SOD1* reflektieren eher eine Adaptation auf die ROS-Veränderungen im Zytosol der Hepatozyten.

Mitochondrial entstehende Superoxidanionen werden durch die SOD2 inaktiviert. Die Genexpression der *SOD2* in der Leber war bei ALR-Tieren deutlich geringer als bei AKR-Tieren. Zusätzlich wiesen ALR-Tiere eine konstante, AKR-Tiere hingegen eine stetig zunehmende *SOD2*-Genexpression über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24 Monaten auf (Abb. 3.8). Der SOD2 wurde in zahlreichen Studien eine zentrale Bedeutung bei der oxidativen Abwehr sowie dem Überleben der Zellen bzw. Geweben beigemessen. Ein Knockout der *SOD2* in Mäusen des C57BL/6-Stammes führte zu einem frühen Tod in der Neonatalphase, wohingegen der SOD1-Knockout lediglich eine leicht verkürzte Überlebenszeit zur Folge hatte [29,62,153]. Auf der anderen Seite kann die Überexpression der SOD2 negative Effekte auf den Zellmetabolismus ausüben, da mitochondriale ROS als Stresssignal-Moleküle dienen und als mitohormetische Gegenregulation den Flux der Atmungskette reduzieren (1.3.4) [81]. So besteht auch das Risiko, dass eine übermäßige Reduzierung der mitochondrialen Funktion zu einer schlechteren Stressabwehr innerhalb der Zelle führt [108]. Das niedrige *SOD2*-Genexpressionsniveau beim ALR-Mausstamm spricht für eine erniedrigte Generierung von Superoxidanionen, die im Lebensalter von 3 Monaten als mitohormetischer Effekt oder geringe mitochondriale Performance zur ROS-Produktion interpretiert werden kann. Daher war eine adaptive Erhöhung der *SOD2*-Genexpression in den folgenden Monaten nicht erforderlich. Ab dem 18. Lebensmonat nahm die Superoxidanionen-Bildung jedoch stark zu (Abb. 3.3B). Die Genexpression der *SOD2* passte sich allerdings kaum dieser gesteigerten Superoxidanionen-Bildung an (Abb. 3.8). Eine mitohormetische Kompensation des oxidativen Stresses im ALR-Stamm ist somit im späten Lebensalter eingeschränkt.

In Lebergewebe der AKR-Kontrolltiere wurden im Verlauf der Alterung steigende Superoxidanionen-Level bestimmt (Abb. 3.3B), die eine steigende *SOD2*-Genexpression zur Folge hatte (Abb. 3.8). Die mitohormetische Protektion der Mitochondrien in der frühen Lebensphase blieb daher aus.

Der relativ stabile Expressionsverlauf der *Katalase* (Abb. 3.9) in beiden Mausstämmen spricht für die zentrale Bedeutung von mitochondrial gebildeten ROS als mitohormetischen Trigger.

Die extramitochondriale ROS-Bildung scheint daher weitgehend unabhängig von der mitochondrialen Atmungskettenfunktion zu sein.

Beim AKR-Mausstamm korrelierte der progrediente Anstieg der Superoxidanionen-Konzentration (Abb. 3.3B) mit einer Zunahme der Genexpression des *Uncoupling Protein 2* (Abb. 3.10). Diese Daten stehen im Einklang mit zahlreichen Publikationen, die eine Aktivierung von UCP2 durch mitochondrial gebildete Superoxidanionen belegen konnten [17,31,67,73,75,154,155]. Die Abnahme der *UCP2*-Genexpression im Alter von 24 Monaten erklärt sich am ehesten aus der Verringerung der mitochondrialen Masse, was aus der *TFAM*-Expression (Abb. 3.6), der mtDNA-Kopienzahl (Abb. 3.4) und der Atmungskettenkomplex-Proteinexpression (Abb. 3.15) ersichtlich ist. Beim ALR-Mausstamm mit dem *mtND2*-Genpolymorphismus ließ sich hingegen über den gesamten Untersuchungsverlauf keine Korrelation der *UCP2*-Genexpression zum Superoxidanionen-Level (Abb. 3.3B) aufzeigen. UCP2 wirkt nicht nur als Entkoppler der Atmungskette, sondern beeinflusst den Metabolismus von Glukose und freien Fettsäuren [154,156,157]. Daher wurde kürzlich ein antioxidativer Effekt dieses Proteins von einigen Autoren in Frage gestellt [158]. In den frühen Monaten ist die Superoxidanionen-Konzentration beim ALR-Mausstamm gering. Mitohormetische Effekte durch UCP2 kämen hier durch das geringe Stressniveau nicht zum Tragen. Bei einem starken Anstieg mitochondrial gebildeter ROS könnte das UCP2 jedoch seine entkoppelnde Wirkung entfalten, um oxidative Schäden der Zelle zu vermeiden. Ein solcher Anstieg liegt bei ALR-Mäusen im Alter von 18 Monaten vor, so dass ein *UCP2*-Anstieg im Alter von 24 Monaten hierüber erklärbar ist.

Zusammenfassend hat die *ND2*-Mutation keine Effekte auf die Inaktivierung von extramitochondrialen ROS (über SOD1 und Katalase), wobei UCP2 über den Alterungsverlauf in Lebergewebe keine zentrale Rolle bei der mitohormetischen Adaptation spielt. Die *SOD2*-Genexpression im hepatischen Gewebe mit der *ND2*-Mutation war signifikant niedriger als im AKR-Kontrollstamm. Mausstämmen mit einer *ND2*-Mutation wurde ein erhöhtes Potenzial der oxidativen Verteidigung [159–161] mit einer verlängerten Überlebenszeit [162–165] zugesprochen. Die Studien haben jedoch nicht konsequent die Mitochondrienfunktion im oxidativen Stoffwechsel dokumentiert. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen jedoch für, von ROS unabhängige, mitohormetische Trigger, die z.B. in der Funktion des OXPHOS-Systems und der Mitomasse über Fission/Fusion Signalwege liegen könnten.

4.5 Einfluss des mtND2-Gens auf die altersabhängige Expression von Seneszenzmarkern im B6-Mausstamm

Beim ALR-Mausstamm war die Proteinexpression des Histons γ -H2A.X im Alter von 3 bis 18 Monaten geringer als beim AKR-Kontrollstamm (Abb. 3.12). Schauer et al. (2015) wiesen ebenfalls eine geringere Expression dieses Histons im ALR-Stamm nach [100]. Das Histon γ -H2A.X bindet sehr spezifisch an geschädigte nukleäre nDNA. Da die Konzentration mit dem Ausmaß des nDNA-Schadens korreliert [111,112], ist anzunehmen, dass ALR-Tiere bis zu einem Alter von 18 Monaten weniger nDNA-Schäden aufwiesen als AKR-Tiere, was den Alterungsprozess verlangsamen könnte. Im Alter von 24 Monaten stiegen die Histon-Proteinexpression (Abb. 3.12) und die mitochondriale Superoxidanionen-Konzentration (Abb. 3.3B) sehr stark an. Mitochondrial gebildete ROS könnten vermehrt zu Schäden an der nDNA führen. Da dieser Effekt erst in einem fortgeschrittenen Lebensalter beobachtet wurde, hat er wahrscheinlich wenig Auswirkung auf die Lebenszeit der ALR-Tiere.

Die mTOR-Proteinexpression beider Stämme konnte keine signifikanten Unterschiede aufzeigen (Abb. 3.11). Dies erklärt sich aus dem identischen Nährstoffangebot (2.5.2) für beide Mausstämme. Es ist allgemein akzeptiert, dass Superoxidanionen die mTOR-Aktivität steigern [67,100,103], was im Einklang mit der ROS-Konzentration (Abb. 3.3B) und der *SOD2*-Expression (Abb. 3.8) beim ALR-Stamm steht. Eine geringe mTOR-Aktivität spricht zudem für effiziente Autophagie-Prozesse, weniger mtDNA-Mutationen, erhöhter Lebensdauer und ein geringeres Maß an alterungsbedingten Erkrankungen [100–105,108,146,166–168]. Möglicherweise führt die ND2-Genmutation infolge geringerer Superoxidanionen-Konzentrationen im juvenilen Lebensabschnitt zu einer tendenziell verminderten mTOR-Proteinexpression.

Ein weiterer wichtiger Alterungsmarker stellt die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 dar. Die Proteinexpression von p53 war über den gesamten Alterungsverlauf bei Tieren mit dem ND2-Polymorphismus geringer ausgeprägt als bei den AKR-Kontrolltieren (Abb. 3.13). Die verminderte Proteinexpression von p53 konnte ebenfalls durch einen Kooperationspartner in Fibroblasten des conplastischen ALR-Mausstamms nachgewiesen werden [100].

Eine geringe p53-Expression soll vor Tumorentstehung und Alterung schützen, indem es zu einem Zellzyklusarrest führt, welcher für die Reparatur der nDNA und mtDNA und Autophagie-Prozesse innerhalb der Zelle genutzt werden kann [10,14,117,144,169]. Eine hohe p53-Expression bei zellulärem Stress und DNA-Schädigung führt zur Apoptose [82,117,169,170]. Dies verhindert Tumorentstehung, führt jedoch bei postmitotischen

Gewebe zu einem Verlust der Zellmasse [14]. Die p53-Expression wird auch in Abhängigkeit der intrazellulären ROS-Konzentration reguliert [14,31]. Hieraus erklärt sich die Zunahme der p53-Expression beim AKR-Stamm.

Die p53-Expressionsdaten stützen die Hypothese, dass die *ND2*-Mutation durch die verminderte ROS-Produktion und die veränderte mitochondriale Performance den Alterungsprozess verlangsamen kann.

4.6 Immunzelladaptation der ALR- und AKR-Maus

Im Alter lässt die Funktionalität des Immunsystems nach und kann zu gehäuften Infektionen und Erkrankungen, aber auch zur Tumorentstehung führen [168]. Da das metabolische Syndrom eine starke immunologische Komponente besitzt, war es sinnvoll mit Hilfe des Advia-Systems einen Immunzellstatus im Blut zu erheben. Dabei galt es zu klären, ob im ALR-Mausstamm mit der *ND2*-Mutation Veränderungen des zellulären Immunsystems im Alterungsverlauf erkennbar sind. Dazu erfolgten Blutentnahmen im Alter zwischen 3 und 24 Monaten.

Dabei zeigten sich stabile Leukozytenzahlen im ALR-Stamm, die gegenüber dem Kontrollstamm nicht signifikant unterschiedlich ausfielen (Abb. 3.16A). Auffällig war hingegen bei dem AKR-Stamm ein altersabhängiger Anstieg der neutrophilen Granulozyten, der im ALR-Stamm nicht nachweisbar war. Somit scheint die *ND2*-Mutation Anstiege des Innate Immune Systems nicht zu begünstigen. Immunzellanalysen geben im vorliegenden Versuchsprotokoll jedoch keine Auskunft über den Aktivierungsstatus und das Zytokin-/Chemokininmuster. Neuere Daten der Arbeitsgruppe konnten belegen, dass die *TNF α* -Genexpression des Lebergewebes als Surrogatmarker des metabolischen Syndroms über den gesamten Altersverlauf in Lebergewebe bei der *ND2*-Mutante geringer ausfiel (Dr. Mandy Wietzke, persönliche Mitteilung).

TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches im Rahmen von Entzündungsreaktionen v.a. von Makrophagen und Lymphozyten gebildet wird [23,113]. Es führt dann zur Chemotaxis von Immunzellen wie den neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsort. Außerdem kann *TNF α* über die Induktion von NF κ B und der MAP-Kinase p38 zur Apoptose führen [66,67,79,125]. Alternde Gewebe wurden in der Vergangenheit durch eine stärkere Inflammation und vermehrte *TNF α* -Expression charakterisiert [169,170]. Dementsprechend ist anzunehmen, dass ALR-Tiere infolge der geringeren Genexpression von *TNF α* ein geringeres Risiko zur Entwicklung einer Hepatosteatose aufweisen.

4.7 Einfluss der *mtND2*-Mutation auf mitoprotektive Signalwege und die Entstehung altersrelevanter Erkrankungen

Eine geringfügige und kurzzeitige Konzentrationserhöhung reaktiver Sauerstoffspezies kann zu Veränderungen an Lipiden und Proteinen einer Zelle, wie z.B. der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) führen. Diese führt zur Steigerung der Mitochondrien- und damit zu einer Steigerung der Atmungskettenaktivität und zur vermehrten Produktion mitochondrialer ROS. Die erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kann die Induktion der Enzyme der oxidativen Verteidigung zur Folge haben [167]. Als Konsequenz können ROS besser detoxifiziert werden. Dieser Schutzmechanismus sorgt dafür, dass die ROS-Konzentration im Altersverlauf auf einem niedrig stabilen Niveau gehalten werden kann. Der hier beschriebene Mechanismus wird als Mitohormesis bezeichnet und wird für ein längeres bzw. gesünderes Leben von Organismen verantwortlich gemacht (1.3.4).

Der ALR-Stamm bildete im Alter von 3 Monaten zwar geringfügig mehr Superoxidanionen in den Leber-Mitochondrien, lag aber bis zum 12. Lebensmonat auf einem geringeren Niveau im Vergleich zum AKR-Stamm (Abb. 3.3B). Erst im fortgeschrittenen Lebensalter von 18 und 24 Monaten stieg die ROS-Akkumulation stark an. Die *ND2*-Mutation bewirkt wahrscheinlich durch eine niedrige Mitomasse eine geringere ROS-Produktion. Nach der Mitohormesis-Theorie erklärt sich hieraus auch das geringe Expressionsniveau der SOD2 (Abb. 3.8).

Schauer et al. (2015) konnten in Fibroblasten eine erhöhte Komplex-I-Aktivität zum Zeitpunkt 12 Monate im ALR-Mausstamm im Vergleich zum Kontrollstamm messen [100]. Zu diesem Zeitpunkt war auch in dieser Promotionsarbeit die Proteinexpression des Atmungskettenkomplexes I bei ALR-Tieren signifikant erhöht. Bei Betrachtung des Gesamalterungsverlaufs, ist dieses Phänomen als Kompensation für funktionelle Störungen im gestörten oxidativen Stoffwechsel zu werten.

Studien konnten zeigen, dass eine Überexpression der antioxidativen Enzyme mitohormetische Effekte nicht verstärkte, sondern, im Gegenteil, diese sogar unterdrückte und damit die Alterung beschleunigte [29,55,171–173]. Diese Studien haben aber die endogene mitochondriale ROS-Produktion, die durch die Mitomasse und -funktion bestimmt wird, nicht hinreichend beachtet. Konkret bedeutet dies, dass ein niedriges mitochondriales Aktivitätsniveau den besten Schutzmechanismus für eine Zelle darstellen könnte. Hieraus leitet sich ab, dass Alterungsmarker geringer exprimiert sind und in Analogie zu anderen Studien weniger Mitochondriopathien entstehen können [4,24,148,174].

Hohe zelluläre ROS-Konzentrationen sind im hohen Lebensalter in nahezu allen Geweben conplastischer Mausstämme nachweisbar (Prof. Tiedge, persönliche Mitteilung). Dieser Anstieg ist als Dekompensation im mitochondrialen System zu werten, woraus sich erklärt, dass die Überlebensraten in einem sehr engen Zeitfenster abfallen. Daher muss der ALR-Stamm nicht notwendigerweise ein höheres Lebensalter zeigen (die Versuche hierzu sind noch nicht abgeschlossen). Andererseits kann das geringere Basisniveau der mitohormetischen Marker ab dem Lebensalter von 18 Monaten nicht mehr ausreichen, um zelluläre Schäden durch die hohen ROS-Konzentrationen zu vermeiden.

Es stellt sich natürlich die Frage, welche Implikationen die Daten für den Verlauf von Stoffwechselerkrankungen und alterungsbedingten Erkrankungen haben. Zu den bedeutendsten Stoffwechselerkrankungen des alternden Organismus gehören aufgrund der epidemischen Zunahme der Adipositas das metabolische Syndrom mit seinen Folgeerkrankungen des kardiovaskulären Systems, sowie, als ein wesentlicher Trigger für den Übergang in einen Typ 2 Diabetes mellitus, die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) (1.5.1).

Ätiologisch spielt bei beiden Erkrankungen die Überernährung durch Kohlenhydrate und Fette eine entscheidende Rolle. Die exzessive Überlastung metabolisch-relevanter Gewebe wie Leber und Fettgewebe führt über den erhöhten mitochondrialen Stoffwechsel zur Bildung von ROS [126,154,175]. Die ROS-Level fördern wiederum die Entwicklung von Entzündungen mittels der Induktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α [66,86,94,176–178]. Dies erklärt, warum eine konsequente Kalorienrestriktion zu einer Steigerung des Lebensalters führt [151,179]. Bei genetischer Determinierung einer niedrigen mitochondrialen Masse könnte ein Mitochondrium auf Niedrigenergieniveau die Belastungen durch hochkalorische Diäten abfangen. Der untersuchte ALR-Mausstamm wies in der Studie ein geringeres Körpergewicht im Vergleich zum AKR-Mausstamm auf (Abb. 3.1).

Hohe Blutglukosekonzentrationen führen über den mitochondrialen Stoffwechsel zur erhöhten ROS-Bildung wodurch eine Insulinresistenz und die Progression zu einem Typ 2 Diabetes mellitus begünstigt wird [178,180].

Wenn subkutane Fettspeicherung durch die Insulinresistenz beeinträchtigt wird, kommt es in der Leber aufgrund eines gestörten Lipoproteinstoffwechsels zur Entwicklung einer Steatosis hepatis [23,125,126]. Dieser Prozess wird durch proinflammatorische Zytokine aus dem viszeralen Fettgewebe verstärkt. In Folge resultiert die Entzündung der Hepatozyten, also eine Steatohepatitis, die über die Freisetzung von Hepatokinen wie dem Fetuin A wiederum die Insulinresistenz verstärkt [121,126].

Die Erkrankungsbilder des metabolischen Syndroms und der NAFLD sind dementsprechend pathogenetisch eng miteinander verknüpft. Über Mikro- und Makroangiopathien infolge der Atherosklerose hat die Leber eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung altersrelevanter Erkrankungen. Welche Strategien ergeben sich aus dem Verlauf mitohormetischer Adaptationsprozesse? (1) Kalorienrestriktionen sind in der Adoleszenzphase besonders effizient, da die mitochondriale Adaptation zugunsten hoher mitochondrialer ROS-Produktionen effektiv verhindert werden kann. (2) Die Absenkung des mitochondrialen Aktivitätsniveaus ist eine wichtigere Maßnahme zur Therapie des metabolischen Syndroms als die Gabe von Antioxidantien zur Detoxifizierung von ROS.

4.8 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern bereits einige interessante Ergebnisse zur Bedeutung der mitochondrialen *ND2*-Genmutation auf die Alterung. In der Perspektive sollten weiterführende Studien die Adaptationsmechanismen unter einer hyperkalorischen Diät und Hochfettdiät untersuchen. Wenn diese Diäten zu verschiedenen Alterszeitpunkten gestartet werden, lassen sich sensitive Perioden für die Entwicklung einer Fettleber und eines Diabetes mellitus identifizieren. Neben den bereits in der Promotionsarbeit ermittelten mitochondrialen Parametern sollten im nächsten Schritt die Mitochondrienultrastruktur und Mitochondrienfunktion in isolierten Hepatozyten charakterisiert werden. Sauerstoffverbrauchsmessungen lassen dann auch Aussagen über die Adaptationsfähigkeit des OXPHOS-Systems zu. Im Rahmen der mitochondrialen Strukturuntersuchungen mittels Multiphotonenmikroskopie können auch Marker des mitochondrialen Fission/Fusion-Systems untersucht werden. In einer langfristigen Strategie wäre es zudem sinnvoll, die mitochondriale *ND2*-Mutation auf einen Mausstamm zu kreuzen, die per se eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung eines Diabetes mellitus besitzt wie z.B. dem NZO (New Zealand Obese)-Mausstamm. Mit diesem Modell stünde dann ein ideales Modell für Interventionsstudien zur Adipositas- und Diabetesprävention zur Verfügung, das eine hohe Analogie zum Menschen besitzt.

5 Zusammenfassung

Mutationen des mitochondrialen Genoms bedingen eine Reihe von Erkrankungen, wie beispielsweise Neurodegeneration, Autoimmunität, Adipositas und Diabetes mellitus. Zudem spielt das mitochondriale Genom für den Alterungsprozess eine wichtige Rolle. Mitochondriale Polymorphismen in OXPHOS-Genen sind mit der Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) und der Lebenszeit assoziiert. Es war das Ziel der Arbeit, den Effekt des mitochondrialen *ND2*-Gens auf den Kohlenhydratstoffwechsel sowie die Expression metabolisch relevanter Gene und Proteine in der Leber im Verlauf der Alterung zu charakterisieren. Hierzu wurden conplastische Mausstämme eingesetzt, die sich nur im mitochondrialen Genom bei identischem nukleären Genom unterscheiden. Der B6-mt^{ALR} Mausstamm (ALR) besitzt eine Mutation im *ND2*-Gen im Vergleich zum B6-mt^{AKR}-Kontrollstamm (AKR). Die Tiere wurden bis zu einem Lebensalter von 24 Monaten charakterisiert.

In der Leber zeigte sich ein divergentes Verhalten der ROS-Generierung im Verlauf der Alterung. Während ALR-Tiere im ersten Lebensjahr geringere ROS-Level zeigten, stiegen diese im zweiten Lebensjahr gegenüber AKR-Tieren signifikant an. Dabei war im ALR-Stamm die Kopienzahl des mitochondrialen Genoms niedriger, die Expression von *TFAM* im zweiten Lebensjahr jedoch erhöht. Die Expression der *mitochondrialen Superoxiddismutase SOD2* war im ALR-Stamm erniedrigt, wobei die Differenz zum AKR-Stamm im fortgeschrittenen Lebensalter besonders hoch ausfiel. Die Expression des *Uncoupling Protein 2 (UCP2)* korrelierte hierbei in ALR-Tieren weder mit der ROS-Generierung, noch mit der *SOD2*-Expression. Der ALR-Stamm zeigte eine geringere Expression der OXPHOS-Proteine. Die Alterungsmarker p53 und H2A.X waren in ALR-Tieren ebenfalls geringer exprimiert. Die *ND2*-Mutation ist somit mit einer geringeren mitochondrialen Performance und Dynamik korreliert, die bis zum 18. Lebensmonat mit einer geringeren ROS-Produktion einhergeht. Der Anstieg der ROS-Level bewirkt im fortgeschrittenen Lebensalter keine mitohormetische Antwort. Die Daten sprechen dafür, dass eine niedrige mitochondriale Performance im oxidativen Stoffwechsel protektiv gegenüber der Zellalterung ist. Der hierfür gezahlte Preis ist jedoch eine geringere mitohormetische Antwort im fortgeschrittenen Lebensalter, die zu einer Abnahme der Organfunktion führen kann. Die systematische Untersuchung des humanen mitochondrialen Genoms eröffnet somit die Möglichkeit, Polymorphismen zu identifizieren, die mit einem hohen Risiko einer metabolischen Dekompensation einhergehen. Diese Patienten würden von einer Kalorienrestriktion im Hinblick auf eine Diabetesprävention besonders profitieren.

6 Thesen

1. Mutationen des mitochondrialen Genoms (mtDNA) spielen eine wichtige Rolle für Alterungsprozesse sowie in der Pathogenese multifaktorieller Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus und dem metabolischen Syndrom.
2. Conplastische Mausstämme stellen ein wichtiges Modellsystem für die Untersuchung von definierten mtDNA-Mutationen in Langzeitstudien und für die Entwicklung therapeutischer Strategien dar.
3. Der B6-mt^{ALR}-Mausstamm (ALR) zeichnet sich im Vergleich zum B6-mt^{AKR} (AKR)-Kontrollstamm durch einen Polymorphismus des *ND2*-Gens aus, der für eine Untereinheit des Komplex I der Atmungskette kodiert.
4. Geringe Unterschiede in der mitochondrialen Aktivität und Dynamik führen im Alterungsverlauf zur Abnahme zellulärer Funktionen und mitohormetischer Antworten.
5. ALR-Mäuse zeigen mit Ausnahme des späten Lebensalters eine geringe ROS-Produktion in der Leber. Zudem belegen niedrige mtDNA- und OXPHOS-Proteinexpressionen eine erniedrigte mitochondriale Performance.
6. Die erniedrigte mitochondriale Performance in der Leber von ALR-Tieren erklärt das niedrige Expressionsniveau der antioxidativen Enzyme.
7. Die niedrige mitochondriale Aktivität führt zu einer geringen Expression von Alterungsmarkern und Schutz vor alterungsbedingten zellulären Funktionsstörungen.
8. Genpolymorphismen die zu einer erniedrigten mitochondrialen Aktivität und ROS-Produktion führen zeigen eine geringere Fetteinlagerung in der Leber.
9. Die funktionelle Charakterisierung von mitochondrialen Genpolymorphismen stellt die Basis für eine Risikostratifizierung der Hepatosteatose dar.
10. Im hohen Lebensalter kann eine erniedrigte Mitohormesis die ROS-Produktion in Geweben verstärken und zur Dekompensation von Organsystemen führen.
11. Kalorienrestriktionen sind bei der Protektion vor einer Hepatosteatose und der Entwicklung eines Diabetes mellitus ein wichtiger therapeutischer Ansatz zur Senkung der mitochondrialen Aktivität.
12. Die Adoleszenz und das späte Lebensalter sind sensitive Perioden für den therapeutischen Einsatz einer Kalorienrestriktion.

7 Literaturverzeichnis

1. Kirkwood, Thomas B L: **Understanding the odd science of aging.** *Cell* 2005, **120**:437-447.
2. Wiesner RJ, Zsurka G, Kunz WS: **Mitochondrial DNA damage and the aging process: facts and imaginations.** *Free Radic Res* 2006, **40**:1284-1294.
3. Harman D: **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.** *J Gerontol* 1956, **11**:298-300.
4. Dufour E, Larsson N-G: **Understanding aging: revealing order out of chaos.** *Biochimica et biophysica acta* 2004, **1658**:122-132.
5. Mandavilli BS, Santos JH, van Houten B: **Mitochondrial DNA repair and aging.** *Mutat Res* 2002, **509**:127-151.
6. Patrushev M, Kasymov V, Patrusheva V, Ushakova T, Gogvadze V, Gaziev AI: **Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice.** *Mitochondrion* 2006, **6**:43-47.
7. Suter M, Richter C: **Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases.** *Biochemistry* 1999, **38**:459-464.
8. Harman D: **The biologic clock. The mitochondria?** *Journal of the American Geriatrics Society* 1972, **20**:145-147.
9. Hayflick L: **How and why we age.** *Exp Gerontol* 1998, **33**:639-653.
10. Wiseman H, Halliwell B: **Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer.** *Biochem J* 1996, **313** (Pt 1):17-29.
11. Rattan, Suresh I S: **Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals.** *Free radical research* 2006, **40**:1230-1238.
12. Rensing L, Rippe V: **Zelluläre Mechanismen des Alterns.** In *Altern*. Edited by Rensing L, Rippe V. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014:15-51.
13. Holliday R: **Aging is no longer an unsolved problem in biology.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1067**:1-9.
14. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G: **Senescence and aging: the critical roles of p53.** *Oncogene* 2013, **32**:5129-5143.
15. Chan DC: **Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development.** *Cell* 2006, **125**:1241-1252.

16. Trifunovic A, Hansson A, Wredenberg A, Rovio AT, Dufour E, Khvorostov I, Spelbrink JN, Wibom R, Jacobs HT, Larsson N-G: **Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, **102**:17993-17998.
17. Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB: **The mitochondrial uncoupling-protein homologues.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:248-261.
18. Logan DC: **The mitochondrial compartment.** *Journal of experimental botany* 2006, **57**:1225-1243.
19. Skulachev VP: **Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong".** *IUBMB Life* 2000, **49**:365-373.
20. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Stryer Biochemie*. 7th edition. Heidelberg: Spektrum; 2012 [*Springer-Spektrum-Lehrbuch*].
21. Koopman, Werner J H, Nijtmans, Leo G J, Dieteren, Cindy E J, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink, Jan A M, Willems, Peter H G M: **Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation.** *Antioxidants & redox signaling* 2010, **12**:1431-1470.
22. Kühlbrandt W: **Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes.** *BMC biology* 2015, **13**:89.
23. Löffler G: *Biochemie und Pathobiochemie: Mit 192 Tabellen; [+ online specials]*. 8th edition. Heidelberg: Springer; 2007 [*Springer-Lehrbuch*].
24. Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D: **Mitochondrial DNA mutations in human cancer.** *Oncogene* 2006, **25**:4663-4674.
25. Tanaka M, Gong J, Zhang J, Yamada Y, Borgeld HJ, Yagi K: **Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis.** *Mech Ageing Dev* 2000, **116**:65-76.
26. Clayton DA: **Structure and function of the mitochondrial genome.** *J Inherit Metab Dis* 1992, **15**:439-447.
27. Rothman SM: **Mutations of the mitochondrial genome. Clinical overview and possible pathophysiology of cell damage.** *Biochemical Society symposium* 1999, **66**:111-122.
28. Triepels RH, Van Den Heuvel, L P, Trijbels JM, Smeitink JA: **Respiratory chain complex I deficiency.** *Am J Med Genet* 2001, **106**:37-45.
29. Fukai T, Ushio-Fukai M: **Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases.** *Antioxid Redox Signal* 2011, **15**:1583-1606.

30. Lydia Wuchert-Wünnemann: **Einfluss einer Cytochrom-c-Oxidase Mutation auf alterungsbedingte Adaptationsvorgänge im organspezifischen Zellstoffwechsel.** *Dissertation.* Universität Rostock, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie; 2014.
31. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T: **Mitochondria, oxidants, and aging.** *Cell* 2005, **120**:483-495.
32. Matsunaga H, Tanaka Y, Tanaka M, Gong JS, Zhang J, Nomiya T, Ogawa O, Ogihara T, Yamada Y, Yagi K, Kawamori R: **Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 2001, **24**:500-503.
33. Taylor RW, Turnbull DM: **Mitochondrial DNA mutations in human disease.** *Nature reviews. Genetics* 2005, **6**:389-402.
34. van der Bliek, Alexander M, Shen Q, Kawajiri S: **Mechanisms of mitochondrial fission and fusion.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, **5**.
35. DiMauro S, Schon EA: **Mitochondrial DNA mutations in human disease.** *Am J Med Genet* 2001, **106**:18-26.
36. Parisi MA, Clayton DA: **Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins.** *Science* 1991, **252**:965-969.
37. Kühl I, Miranda M, Posse V, Milenkovic D, Mourier A, Siira SJ, Bonekamp NA, Neumann U, Filipovska A, Polosa PL, Gustafsson CM, Larsson N-G: **POLRMT regulates the switch between replication primer formation and gene expression of mammalian mtDNA.** *Science advances* 2016, **2**:e1600963.
38. Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, Rustin P, Gustafsson CM, Larsson N-G: **Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals.** *Human molecular genetics* 2004, **13**:935-944.
39. Shi Y, Dierckx A, Wanrooij PH, Wanrooij S, Larsson N-G, Wilhelmsson LM, Falkenberg M, Gustafsson CM: **Mammalian transcription factor A is a core component of the mitochondrial transcription machinery.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**:16510-16515.
40. Yoshida Y, Izumi H, Ise T, Uramoto H, Torigoe T, Ishiguchi H, Murakami T, Tanabe M, Nakayama Y, Itoh H, Kasai H, Kohno K: **Human mitochondrial transcription factor A binds preferentially to oxidatively damaged DNA.** *Biochemical and biophysical research communications* 2002, **295**:945-951.
41. Fisher RP, Clayton DA: **Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1.** *Mol Cell Biol* 1988, **8**:3496-3509.

42. Kukat C, Davies KM, Wurm CA, Spahr H, Bonekamp NA, Kuhl I, Joos F, Polosa PL, Park CB, Posse V, Falkenberg M, Jakobs S, Kuhlbrandt W, Larsson N-G: **Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015, **112**:11288-11293.
43. Shutt TE, Lodeiro MF, Cotney J, Cameron CE, Shadel GS: **Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system in vitro.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:12133-12138.
44. Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS, Sazanov LA: **Crystal structure of the entire respiratory complex I.** *Nature* 2013, **494**:443-448.
45. Koopman, Werner J H, Distelmaier F, Smeitink, Jan A M, Willems, Peter H G M: **OXPHOS mutations and neurodegeneration.** *EMBO J* 2013, **32**:9-29.
46. Efremov RG, Sazanov LA: **Structure of the membrane domain of respiratory complex I.** *Nature* 2011, **476**:414-420.
47. Brand MD: **Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing.** *Exp Gerontol* 2000, **35**:811-820.
48. Mitchell P: **Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.** **1966.** *Biochimica et biophysica acta* 2011, **1807**:1507-1538.
49. Ludwig B, Bender E, Arnold S, Huttemann M, Lee I, Kadenbach B: **Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation.** *Chembiochem* 2001, **2**:392-403.
50. Boekema EJ, Braun H-P: **Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**:1-4.
51. Schägger H: **Respiratory chain supercomplexes.** *IUBMB Life* 2001, **52**:119-128.
52. Shoubridge EA: **Supersizing the mitochondrial respiratory chain.** *Cell Metabolism* 2012, **15**:271-272.
53. Barja G: **Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies.** *Rejuvenation Res* 2007, **10**:215-224.
54. Brown GC, Borutaite V: **There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells.** *Mitochondrion* 2012, **12**:1-4.
55. Cui H, Kong Y, Zhang H: **Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging.** *Journal of signal transduction* 2012, **2012**:646354.

56. Pi J, Collins S: **Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic beta-cell function.** *Diabetes Obes Metab* 2010, **12 Suppl 2**:141-148.
57. Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V: **Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease.** *Neurochem Res* 2004, **29**:569-577.
58. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S: *Physiologie: ... 68 Tabellen*. 6th edition. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2010 [*Thieme ElectronicBook Library*].
59. Waypa GB, Smith KA, Schumacker PT: **O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting.** *Molecular aspects of medicine* 2016, **47-48**:76-89.
60. Leeuwenburgh C, Pamplona R, Sanz A: **Mitochondria and aging.** *J Aging Res* 2011, **2011**:782946.
61. Mailloux RJ, Harper M-E: **Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins.** *Trends Endocrinol Metab* 2012, **23**:451-458.
62. Casteilla L, Rigoulet M, Penicaud L: **Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins.** *IUBMB Life* 2001, **52**:181-188.
63. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ: **Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III.** *J Biol Chem* 2003, **278**:36027-36031.
64. Liu Y, Fiskum G, Schubert D: **Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain.** *J Neurochem* 2002, **80**:780-787.
65. Mahjoub S, Masrou-Roudsari J: **Role of oxidative stress in pathogenesis of metabolic syndrome.** *Caspian journal of internal medicine* 2012, **3**:386-396.
66. Wellen KE, Thompson CB: **Cellular metabolic stress. Considering how cells respond to nutrient excess.** *Mol Cell* 2010, **40**:323-332.
67. Rains JL, Jain SK: **Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes.** *Free Radic Biol Med* 2011, **50**:567-575.
68. Chen Y-R, Zweier JL: **Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation.** *Circ Res* 2014, **114**:524-537.
69. Grivennikova VG, Vinogradov AD: **Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I.** *Biochimica et biophysica acta* 2006, **1757**:553-561.
70. Fukui H, Moraes CT: **The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?** *Trends Neurosci* 2008, **31**:251-256.

71. Nordberg J, Arner, E. S. J.: **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.** *Free radical biology & medicine* 2001, **31**:1287-1312.
72. Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB: **Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes.** *Cell* 2001, **105**:745-755.
73. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N: **Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins.** *Free Radic Biol Med* 2004, **37**:755-767.
74. Miwa S, Brand MD: **Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling.** *Biochem Soc Trans* 2003, **31**:1300-1301.
75. Echtay KS, Murphy MP, Smith, Robin A J, Talbot DA, Brand MD: **Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**:47129-47135.
76. Naudi A, Jove M, Ayala V, Cassanye A, Serrano J, Gonzalo H, Boada J, Prat J, Portero-Otin M, Pamplona R: **Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress.** *Experimental diabetes research* 2012, **2012**:696215.
77. Pamplona R: **Mitochondrial DNA damage and animal longevity: insights from comparative studies.** *Journal of aging research* 2011, **2011**:807108.
78. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, Wang C-R, Schumacker PT, Licht JD, Perlman H, Bryce PJ, Chandel NS: **Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling.** *Immunity* 2013, **38**:225-236.
79. Werner E, Werb Z: **Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases.** *J Cell Biol* 2002, **158**:357-368.
80. Finkel T: **Radical medicine: treating ageing to cure disease.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:971-976.
81. Sena LA, Chandel NS: **Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species.** *Mol Cell* 2012, **48**:158-167.
82. Finkel T, Holbrook NJ: **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature* 2000, **408**:239-247.
83. Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA: **Genes involved in senescence and immortalization.** *Curr Opin Cell Biol* 2000, **12**:705-709.

84. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato, E L O, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R: **Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity.** *J Physiol* 2007, **583**:9-24.
85. Singh U, Jialal I: **Oxidative stress and atherosclerosis.** *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 2006, **13**:129-142.
86. Singh RB, Mengi SA, Xu Y-J, Arneja AS, Dhalla NS: **Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process.** *Experimental and clinical cardiology* 2002, **7**:40-53.
87. Surekha RH, Srikanth, B B M V, Jharna P, Ramachandra RV, Dayasagar RV, Jyothy A: **Oxidative stress and total antioxidant status in myocardial infarction.** *Singapore Med J* 2007, **48**:137-142.
88. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG: **Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis.** *Journal of immunological methods* 2002, **265**:49-72.
89. Butterfield DA, Howard B, Yatin S, Koppal T, Drake J, Hensley K, Aksenov M, Aksenova M, Subramaniam R, Varadarajan S, Harris-White ME, Pedigo, N W Jr, Carney JM: **Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease.** *Life Sci* 1999, **65**:1883-1892.
90. Mathews CE, Leiter EH, Spirina O, Bykhovskaya Y, Gusdon AM, Ringquist S, Fischel-Ghodsian N: **mt-Nd2 Allele of the ALR/Lt mouse confers resistance against both chemically induced and autoimmune diabetes.** *Diabetologia* 2005, **48**:261-267.
91. Tatar M, Bartke A, Antebi A: **The endocrine regulation of aging by insulin-like signals.** *Science* 2003, **299**:1346-1351.
92. Southam CM, Ehrlich J: **Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture.** *Phytopathology* 1943:517-524.
93. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M: **Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress.** *Cell Metab* 2007, **6**:280-293.
94. Ristow M, Schmeisser K: **Mitohormesis. Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS).** *Dose-response: a publication of International Hormesis Society* 2014, **12**:288-341.
95. Lapointe J, Hekimi S: **When a theory of aging ages badly.** *Cell Mol Life Sci* 2010, **67**:1-8.
96. Zarse K, Schmeisser S, Groth M, Priebe S, Beuster G, Kuhlow D, Guthke R, Platzer M, Kahn CR, Ristow M: **Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting**

- mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal.** *Cell Metab* 2012, **15**:451-465.
97. Yan L-J: **Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance.** *Redox biology* 2014, **2C**:165-169.
98. Kawagishi H, Finkel T: **Unraveling the truth about antioxidants: ROS and disease: finding the right balance.** *Nat Med* 2014, **20**:711-713.
99. Hekimi S, Lapointe J, Wen Y: **Taking a "good" look at free radicals in the aging process.** *Trends in cell biology* 2011, **21**:569-576.
100. Schauer M, Kottek T, Schonherr M, Bhattacharya A, Ibrahim SM, Hirose M, Kohling R, Fuellen G, Schmitz U, Kunz M: **A mutation in the NADH-dehydrogenase subunit 2 suppresses fibroblast aging.** *Oncotarget* 2015.
101. Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J: **Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease.** *Circ Res* 2014, **114**:549-564.
102. Schmidt A, Beck T, Koller A, Kunz J, Hall MN: **The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease.** *The EMBO journal* 1998, **17**:6924-6931.
103. Blagosklonny MV: **Aging: ROS or TOR.** *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2008, **7**:3344-3354.
104. Xu S, Cai Y, Wei Y: **mTOR Signaling from Cellular Senescence to Organismal Aging.** *Aging Dis* 2014, **5**:263-273.
105. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M: **mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease.** *Nature* 2013, **493**:338-345.
106. Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L: **Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.** *Cell Metabolism* 2010, **11**:35-46.
107. Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Gutierrez B, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J: **Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes.** *Biochemical pharmacology* 2003, **66**:439-445.
108. Pan Y, Schroeder EA, Ocampo A, Barrientos A, Shadel GS: **Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling.** *Cell Metab* 2011, **13**:668-678.
109. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA:

- Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice.** *Nature* 2009, **460**:392-395.
110. Khorasanizadeh S: **The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation.** *Cell* 2004, **116**:259-272.
111. Kuo LJ, Yang L-X: **Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks.** *In Vivo* 2008, **22**:305-309.
112. Li M, Fang Y: **Histone variants: the artists of eukaryotic chromatin.** *Sci China Life Sci* 2015.
113. Rassow J: *Biochemie: Mit 67 Tabellen; [mit Stoffwechselweg-Animationen]*. 4th edition. Stuttgart: Thieme; 2016 [*Duale Reihe*].
114. Levine AJ, Momand J, Finlay CA: **The p53 tumour suppressor gene.** *Nature* 1991, **351**:453-456.
115. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA: **p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes.** *Nature* 2002, **415**:45-53.
116. Nister M, Tang M, Zhang X-Q, Yin C, Beeche M, Hu X, Enblad G, van Dyke T, Wahl GM: **p53 must be competent for transcriptional regulation to suppress tumor formation.** *Oncogene* 2005, **24**:3563-3573.
117. Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, Aaronson SA: **Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:8576-8585.
118. Marchenko ND, Zaika A, Moll UM: **Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling.** *J Biol Chem* 2000, **275**:16202-16212.
119. Ackermann H: *AllEx: Alles fürs Examen*. 2nd edition. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2014 [*AllEx - Alles fürs Examen, das Kompendium für die 2. ÄP / [Hanns Ackermann ...]; Bd. C*].
120. Sass AC, Wurm S, Scheidt-Nave C: **Alter und Gesundheit: Eine Bestandsaufnahme aus Sicht der Gesundheitsberichterstattung.** *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2010, **53**:404-416.
121. Herold G: *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2013rd edition. Köln: Herold; 2013.

122. Reaven GM: **Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.** *Diabetes* 1988, **37**:1595-1607.
123. Elmaogullari S, Demirel F, Hatipoglu N: **Risk factors that affect metabolic health status in obese children.** *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM* 2017, **30**:49-55.
124. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: **Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.** *Mayo Clinic proceedings* 1980, **55**:434-438.
125. Schröder T, Kucharczyk D, Bar F, Pagel R, Derer S, Jendrek ST, Sunderhauf A, Brethack A-K, Hirose M, Moller S, Kunstner A, Bischof J, Weyers I, Heeren J, Koczan D, Schmid SM, Divanovic S, Giles DA, Adamski J, Fellermann K, Lehnert H, Kohl J, Ibrahim S, Sina C: **Mitochondrial gene polymorphisms alter hepatic cellular energy metabolism and aggravate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis.** *Molecular metabolism* 2016, **5**:283-295.
126. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM: **Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis.** *Free radical biology & medicine* 2012, **52**:59-69.
127. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G: **Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH. Cause or consequence?** *Journal of hepatology* 2018, **68**:335-352.
128. Franziska Koch: **Altersabhängige Effekte infolge von metabolischem und oxidativem Stress im B6-mtFVB Mausstamm mit mt-Atp8 Mutation.** *Dissertation.* Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät; 2015.
129. Yu X, Gimsa U, Wester-Rosenlöf L, Kanitz E, Otten W, Kunz M, Ibrahim SM: **Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains.** *Genome research* 2009, **19**:159-165.
130. Kiselyczynyk C, Holmes A: **All (C57BL/6) Mice are not Created Equal.** *Front Neurosci* 2011, **5**:10.
131. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P: **Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice.** *Atherosclerosis* 1985, **57**:65-73.
132. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS: **Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:15038-15043.
133. Lee LG, Connell CR, Bloch W: **Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**:3761-3766.

134. Tremmel M, Opelz G, Mytilineos J: **High-resolution typing for HLA-DRB1*15 and -DRB1*16 by fluorescence-marked sequence-specific priming (TaqMan assay).** *Tissue Antigens* 1999, **54**:508-516.
135. Sambrook J: *Molecular cloning*. 3rd edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
136. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
137. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
138. Meex RCR, Watt MJ: **Hepatokines. Linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance.** *Nature reviews. Endocrinology* 2017, **13**:509-520.
139. Gusdon AM, Votyakova TV, Reynolds IJ, Mathews CE: **Nuclear and mitochondrial interaction involving mt-Nd2 leads to increased mitochondrial reactive oxygen species production.** *J Biol Chem* 2007, **282**:5171-5179.
140. Kaminski M, Kiessling M, Suss D, Krammer PH, Gulow K: **Novel role for mitochondria: protein kinase C θ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death.** *Molecular and cellular biology* 2007, **27**:3625-3639.
141. Huang G, Chen Y, Lu H, Cao X: **Coupling mitochondrial respiratory chain to cell death: an essential role of mitochondrial complex I in the interferon-beta and retinoic acid-induced cancer cell death.** *Cell death and differentiation* 2007, **14**:327-337.
142. Feng J, Bussi re F, Hekimi S: **Mitochondrial Electron Transport Is a Key Determinant of Life Span in *Caenorhabditis elegans*.** *Developmental Cell* 2001, **1**:633-644.
143. Lee H-C, Wei Y-H: **Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005, **37**:822-834.
144. Canugovi C, Maynard S, Bayne A-CV, Sykora P, Tian J, Souza-Pinto NC de, Croteau DL, Bohr VA: **The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair.** *DNA repair* 2010, **9**:1080-1089.
145. Rothfuss O, Gasser T, Patenge N: **Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:e24.

146. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ: **Selective degradation of mitochondria by mitophagy.** *Archives of biochemistry and biophysics* 2007, **462**:245-253.
147. Korolchuk VI, Miwa S, Carroll B, Zglinicki T von: **Mitochondria in cell senescence. Is mitophagy the weakest link?** *EBioMedicine* 2017.
148. Niemann J, Johne C, Schroder S, Koch F, Ibrahim SM, Schultz J, Tiedge M, Baltrusch S: **An mtDNA mutation accelerates liver aging by interfering with the ROS response and mitochondrial life cycle.** *Free Radic Biol Med* 2017, **102**:174-187.
149. Gusdon AM, Votyakova TV, Mathews CE: **mt-Nd2a suppresses reactive oxygen species production by mitochondrial complexes I and III.** *J Biol Chem* 2008, **283**:10690-10697.
150. Ristow M: **Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits.** *Nat Med* 2014, **20**:709-711.
151. Kharade SV, Mittal N, Das SP, Sinha P, Roy N: **Mrg19 depletion increases S. cerevisiae lifespan by augmenting ROS defence.** *FEBS letters* 2005, **579**:6809-6813.
152. Rattan, Suresh I S: **Hormesis in aging.** *Ageing research reviews* 2008, **7**:63-78.
153. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ: **Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase.** *Nat Genet* 1995, **11**:376-381.
154. Affourtit C, Brand MD: **On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells.** *Biochimica et biophysica acta* 2008, **1777**:973-979.
155. Lowell BB, Shulman GI: **Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes.** *Science* 2005, **307**:384-387.
156. Vogler S, Pahnke J, Rousset S, Ricquier D, Moch H, Miroux B, Ibrahim SM: **Uncoupling protein 2 has protective function during experimental autoimmune encephalomyelitis.** *The American journal of pathology* 2006, **168**:1570-1575.
157. Ricquier D, Bouillaud F: **The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP.** *The Biochemical journal* 2000, **345 Pt 2**:161-179.
158. Kukat A, Dogan SA, Edgar D, Mourier A, Jacoby C, Maiti P, Mauer J, Becker C, Senft K, Wibom R, Kudin AP, Hultenby K, Flogel U, Rosenkranz S, Ricquier D, Kunz WS, Trifunovic A: **Loss of UCP2 attenuates mitochondrial dysfunction without altering ROS production and uncoupling activity.** *PLoS genetics* 2014, **10**:e1004385.

159. Mathews CE, Leiter EH: **Constitutive differences in antioxidant defense status distinguish alloxan-resistant and alloxan-susceptible mice.** *Free Radic Biol Med* 1999, **27**:449-455.
160. Chen J, Gusdon AM, Thayer TC, Mathews CE: **Role of increased ROS dissipation in prevention of T1D.** *Ann N Y Acad Sci* 2008, **1150**:157-166.
161. Mathews CE, Dunn BD, Hannigan MO, Huang C-K, Leiter EH: **Genetic control of neutrophil superoxide production in diabetes-resistant ALR/Lt mice.** *Free Radic Biol Med* 2002, **32**:744-751.
162. Orr WC, Sohal RS: **Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*.** *Science* 1994, **263**:1128-1130.
163. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M: **Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**:38029-38034.
164. Quijano C, Trujillo M, Castro L, Trostchansky A: **Interplay between oxidant species and energy metabolism.** *Redox biology* 2015, **8**:28-42.
165. Sun J, Folk D, Bradley TJ, Tower J: **Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 2002, **161**:661-672.
166. Nacarelli T, Azar A, Sell C: **Inhibition of mTOR Prevents ROS Production Initiated by Ethidium Bromide-Induced Mitochondrial DNA Depletion.** *Frontiers in endocrinology* 2014, **5**:122.
167. Haes W de, Frooninckx L, van Assche R, Smolders A, Depuydt G, Billen J, Braeckman BP, Schoofs L, Temmerman L: **Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:E2501-9.
168. Martinez-Cisuelo V, Gomez J, Garcia-Junceda I, Naudi A, Cabre R, Mota-Martorell N, Lopez-Torres M, Gonzalez-Sanchez M, Pamplona R, Barja G: **Rapamycin reverses age-related increases in mitochondrial ROS production at complex I, oxidative stress, accumulation of mtDNA fragments inside nuclear DNA, and lipofuscin level, and increases autophagy, in the liver of middle-aged mice.** *Experimental gerontology* 2016, **83**:130-138.
169. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM: **The antioxidant function of the p53 tumor suppressor.** *Nat Med* 2005, **11**:1306-1313.
170. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: **A model for p53-induced apoptosis.** *Nature* 1997, **389**:300-305.

171. Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, Shi Y, Epstein CJ: **Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000, **55**:B5-9.
172. Orr WC, Mockett RJ, Benes JJ, Sohal RS: **Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*.** *J. Biol. Chem.* 2003, **278**:26418-26422.
173. Facundo, Hebert T F, de Paula, Juliana G, Kowaltowski AJ: **Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production.** *Free radical biology & medicine* 2007, **42**:1039-1048.
174. Picca A, Pesce V, Fracasso F, Joseph A-M, Leeuwenburgh C, Lezza AMS: **Aging and calorie restriction oppositely affect mitochondrial biogenesis through TFAM binding at both origins of mitochondrial DNA replication in rat liver.** *PloS one* 2013, **8**:e74644.
175. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav, Umesh C S: **Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies.** *Life sciences* 2016.
176. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral, Maria Esmeria, Hoer NF, Boschero AC, Saad, Mario Jose Abdalla: **Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion.** *Endocrinology* 2005, **146**:1576-1587.
177. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS: **A central role for JNK in obesity and insulin resistance.** *Nature* 2002, **420**:333-336.
178. Pettersson US, Christoffersson G, Massena S, Ahl D, Jansson L, Henriksnas J, Phillipson M: **Increased recruitment but impaired function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes.** *PloS one* 2011, **6**:e22480.
179. Blüher M, Kahn BB, Kahn CR: **Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue.** *Science* 2003, **299**:572-574.
180. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka T-a: **Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis.** *Mediators of inflammation* 2010, **2010**:453892.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*p, **p, ***p	statistische Signifikanz
O_2^{2-}	Peroxid
$\cdot OH$	Hydroxylradikal
Δ	delta (Differenz)
§	Paragraph
°C	Grad Celcius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
β	beta
γ	gamma
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Abs.	Absatz
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	Advanced Glycation End Products
AK	Antikörper
AMPK	AMP (Adenosinmonophosphat) aktivierte Kinase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
B6-Mausstamm	Black-6-Mausstamm
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
Cat	Katalase
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
C _T	Cycle threshold
Cu/ZnSOD	Kupfer-Zink-SOD (SOD1)
Cu _A / Cu _B	Kupferzentren A und B
DAF-16/ FOXO	Gen/ Protein Forkhead box protein O
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA Damage Response
dest.	destilliert
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
e ⁻	Elektron
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FAD/ FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid/ reduziertes FAD
Fe	Eisen
FELASA	Federation for Laboratory Animal Science Associations

FMN	Flavinmononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H⁺	Proton
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hydroethidin
HMG	High Mobility Group
HSP-1	Hitzeschockprotein 1
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IMM	Inner Mitochondrial Membrane (Innere Mitochondrienmembran)
JNK	c-Jun-Amino-terminal-Kinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LALLF	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei
LDL	Low Density Lipoprotein
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuropathie
LONP	AAA+ Lon Protease
M.	Morbus
mA	Milliampere
MAP-Kinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MELAS	Mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose, schlaganfallähnliche Episoden
mg	Milligramm
MGB	Minor Groove Binder
min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MnSOD	Mangan-SOD (SOD2)
mtDNA	Mitochondriale DNA
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
mV	Millivolt
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD/ NADH/H⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid/ reduziertes NAD
NAFL	non-alcoholic fatty liver, nichtalkoholische Fettleber
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease, nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NaOH	Natriumhydroxid
NASH	non-alcoholic steatohepatitis, nichtalkoholische Steatohepatitis
ND2	Untereinheit 2 der NADH-Dehydrogenase des Atmungskettenkomplex I
nDNA	Nukleäre DNA
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer

NRF2/ SKN-1	Bezeichnung von Transkriptionsfaktoren
NZO	New Zealand Obese
O₂	Molekularer Sauerstoff
O₂⁻	Superoxidanion
OMM	Outer Mitochondrial Membrane (Äußere Mitochondrienmembran)
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphate Buffered Saline
POLRMT	Humane mitochondriale RNA-Polymerase
PTP	Permeability transition pore
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
Q-Zyklus	“Quinone”- (engl. für Ubiquinon) Zyklus
rel.	relativ
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
S.E.M.	standard error of the mean, Standardfehler
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFAM	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TFB2M	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor B2
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TRITC	Tetramethylrhodamine
tRNA	Transfer-RNA
u.v.m.	und viele(s) mehr
UCP2	Uncoupling Protein 2
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
vs.	versus
w/v	Masse pro Volumen
WBZ	weiße Blutzellen
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Aufbau und Funktionsweise eines Mitochondriums [17].....	3
Abb. 1.2: Mitochondriale DNA [24].....	4
Abb. 1.3: Die mitochondriale Atmungskette [22,44].....	7
Abb. 1.4: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die mitochondriale Atmungskette [68]...	10
Abb. 1.5: Bildung und Metabolisierung reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle [71].....	12
Abb. 1.6: Mitohormesis (modifiziert nach [97]).....	14
Abb. 1.7: Überblick über die Rolle von mTOR im Zellstoffwechsel (modifiziert nach [101])..	16
Abb. 1.8: Zusammenhang zwischen p53 und ROS-Konzentration [117].....	17
Abb. 1.9: Häufigste Diagnosen, der aus dem Krankenhaus entlassenen vollstationären Patienten im Alter von 65 Jahren und älter [120].....	18
Abb. 1.10: Erzeugung conplastischer Mausstämme [129].....	20
Abb. 2.1: Schema zum Ablauf der quantitativen real time PCR (www.medizinische-genetik.de/index.php?id=8688).....	31
Abb. 2.2: Precision Plus Protein TM All Blue Standards #161-0373 (http://www.bio-rad.com/en-us/sku/1610373-precision-plus-protein-all-blue-prestained-protein-standards)....	38
Abb. 3.1: Altersabhängige Entwicklung des Körpergewichts von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	40
Abb. 3.2: Altersabhängiger Verlauf der Nüchtern-Blutglukosekonzentration von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	41
Abb. 3.3: Altersabhängiger Verlauf der hepatischen Superoxidanionen-Konzentration von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	42
Abb. 3.4: Altersabhängige Entwicklung der Kopienzahl der mitochondrialen DNA (mtDNA) in Relation zur nukleären DNA von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	43
Abb. 3.5: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der <i>ND2</i> von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	44
Abb. 3.6: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der <i>TFAM</i> von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	44
Abb. 3.7: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der <i>SOD1</i> von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	45
Abb. 3.8: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der <i>SOD2</i> von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	46

Abb. 3.9: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der <i>Katalase</i> von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	47
Abb. 3.10: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression der <i>UCP2</i> von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	48
Abb. 3.11: Altersabhängiger Verlauf der Genexpression von <i>mTOR</i> von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	49
Abb. 3.12: Altersabhängiger Verlauf der Proteinexpression des Histons H2A.X von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	50
Abb. 3.13: Altersabhängiger Verlauf der Proteinexpression von p53 von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	51
Abb. 3.14: Western-Blot-Analysen der Atmungskettenkomplexe I bis V im altersabhängigen Verlauf.....	51
Abb. 3.15: Altersabhängiger Verlauf der Proteinexpression von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (AK) von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	52
Abb. 3.16: Altersabhängiger Entwicklung der Blutbilder von ALR- (gelb) und AKR- (rot) Mäusen.....	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Durch mitochondriale Mutationen bedingte Erkrankungen [28].....	5
Tab. 1.2: Reaktive Sauerstoffspezies und deren Metabolisierung [71].....	11
Tab. 2.1: Chemikalien und Reagenzien.....	23
Tab. 2.2: Kits.....	23
Tab. 2.3: Methodenspezifische Sonden (Taqman) und Antikörper.....	24
Tab. 2.4: Verbrauchsmaterial.....	24
Tab. 2.5: Chirurgisches Besteck.....	25
Tab. 2.6: Geräte.....	25
Tab. 2.7: Software.....	26
Tab. 2.8: Conplastische Mäusstämmen [129].....	26
Tab. 2.9: Reaktionsansatz cDNA-Synthese.....	30
Tab. 2.10: Ansatz für PCR.....	31
Tab. 2.11: PCR-Zyklen bei der real time PCR.....	32
Tab. 2.12: Pipettierschema für einen Reaktionsansatz.....	34
Tab. 2.13: PCR-Programm für die Ermittlung der mtDNA-Kopienzahl.....	34
Tab. 2.14: Herstellung des RIPA-Lysepuffers.....	35
Tab. 2.15: Herstellung des 4x Trenngelpuffers.....	36
Tab. 2.16: Herstellung des 4x Sammelgelpuffers.....	36
Tab. 2.17: Herstellung des 10x SDS-Laufpuffers.....	36
Tab. 2.18: Herstellung der Ammoniumpersulfat-Lösung (APS).....	36
Tab. 2.19: Herstellung des SDS-Probenpuffers.....	36
Tab. 2.20: Gelzusammensetzung für SDS-PAGE.....	37

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt durch meine Unterschrift, dass ich diese an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotion vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher noch nicht veröffentlicht und keiner in- oder ausländischen Prüfungsbehörde als Dissertation vorgelegt.

Rostock, den 23.03.2018

Elizabeth Meyer

LebenslaufPersönliche Daten

Elizabeth Meyer
geboren am 12. Juni 1991 in Altdöbern
ledig, in einer Lebensgemeinschaft
2 Kinder (2017)
Nationalität: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 01/2017 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie und
Intensivmedizin der Universitätsmedizin Rostock
seit 05/2017 Elternzeit

Studium

2010-2016 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Ärztliche Approbation im November 2016 (Gesamtnote 2,5)

Schulbildung

1997-2010 Berg-Grundschule Doberlug-Kirchhain
Sängerstadt-Gymnasium Finsterwalde
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife 2010 (Note 1,3)

Elizabeth Meyer

Wiesenaue, den 23.03.2018

Tagungsbeiträge

Meyer E., Wietzke M., Koch F., Niemann J., Baltrusch S., Tiedge M., Weiss H.: Dualer Effekt der *ND2*-Genmutation im Komplex I der Atmungskette: ROS-Generierung und Induktion mitoprotektiver Effekte im Verlauf des Alterungsprozesses, 49. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, 2014, Berlin

Wietzke M., Meyer E., Koch F., Niemann J., Weiss H., Baltrusch S., Tiedge M.: Dual effect of *Nd2* gene mutation in complex I of the respiratory chain: ROS generation and induction of mitoprotective effects in the course of aging, 50th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, 2014, Wien

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Markus Tiedge, der mir die Promotion im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie ermöglichte, mir hilfreich mit Rat und Tat zur Seite stand und mir außerdem die Teilnahme am Kongress der Deutschen Diabetesgesellschaft ermöglichte, um dort meine Ergebnisse präsentieren zu dürfen.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei Frau Dr. rer. nat. Mandy Wietzke bedanken, die mir vom ersten Tag an geduldig alle meine Fragen beantwortete, sich stets Zeit für mich nahm, um Probleme zu erörtern und mich immer wieder neu zu inspirieren und motivieren.

Frau Dr. Franziska Koch und Herrn Dr. Jan Niemann möchte ich für die Einführung in die experimentelle Arbeit und die tatkräftige Unterstützung insbesondere bei der Erstellung der Blutbilder und der Auswertung der MitoSOX-Daten danken.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, die stets bemüht waren, aufkommende Fragen zu beantworten oder Probleme zu beheben.

Und ich möchte meinen Freunden und meiner Familie danken. Liebe Christi, du hast meine Arbeit wohl so oft gelesen, wie sonst keiner und könntest sie mittlerweile wahrscheinlich selbst verteidigen. Danke für deine hilfreichen Kommentare und Anmerkungen und danke für die viele Zeit, die du dir genommen hast.

Mama und Papa, ohne euch wäre es mir nicht möglich gewesen diese Arbeit entstehen zu lassen. Ihr habt euch alle Klagen angehört, habt mich immer wieder motiviert und wo ihr auch nur konntet unterstützt.

Paul, du musstest wohl den meisten Frust während des Studiums und der Dissertation auf dich übertragen sehen. Danke, dass du trotzdem immer für mich da warst und bist. Danke, dass du mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückholst, mir neue Kraft gibst, mich unterstützt und forderst. Danke, dass du dich nicht davor scheust mich auch zu kritisieren. Du machst aus mir eine bessere Ärztin, eine bessere Doktorandin und einen besseren Menschen. Danke.